



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2015

**Daniela Salomé  
Moderno do Couto**

**Identificação dos produtos de oxidação de  
glicosfingolípidos por espectrometria de massa**



**Daniela Salomé  
Moderno do Couto**

## **Identificação dos produtos de oxidação de glicosfingolípidos por espectrometria de massa**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT, da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE).

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/UI/0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296).



QOPNA  
UI Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-alimentares

**FCT**

Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Dedico este trabalho ao meu primo Ricardo Moderno,  
porque apesar de ausente no meu coração esteve sempre presente...

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**

professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues**

professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Margarida Sâncio da Cruz Fardilha**

Professora Auxiliar Convidada da Secção Autónoma das Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à minha orientadora Professora Rosário Domingues e ao meu co-orientador Professor Pedro Domingues pelos inúmeros conhecimentos transmitidos, pela confiança no meu trabalho, por nunca terem desistido de mim e essencialmente por nunca terem-me permitido desistir. Quero ainda agradecer-lhes por fazer da minha dissertação um projeto possível. Por tornarem um sonho, o meu mais bonito sonho, uma realidade.

Aos investigadores de doutoramento e a todo o pessoal do laboratório pela boa disposição, disponibilidade, espírito de grupo e entreatajuda. Um agradecimento muito especial à Tânia Melo pela paciência, pelo gosto em transmitir os seus ensinamentos, pelo incontável e incansável apoio. Na vida deparamo-nos com inúmeras pessoas com personalidades distintas, mas encontrar boas pessoas nesta agitada e individualista sociedade torna-se cada vez mais difícil. Deste modo, quero enfatizar este agradecimento, uma vez que ter-me cruzado com a Tânia, neste meu percurso académico, foi uma mais-valia, foi um enorme suporte que nunca será por mim esquecido.

Aos meus amigos de universidade e aos meus amigos e companheiros de longa data pelos momentos de descontração, pelos risos, por desesperos em conjunto, mas com vitórias igualmente compensadoras.

Quero agradecer a toda a minha família por serem isso mesmo uma família. À minha madrinha de batismo Salomé Porto por ver as minhas conquistas como as conquistas dela, por me encorajar sem igual e porque este trabalho não seria possível sem ela, uma vez que me ensinou a ler. Aquele agradecimento muito especial aos meus pais e ao meu irmão por confiarem mais em mim, que às vezes eu própria, por fazerem-me sentir capaz, por todos os incentivos e por, todos os dias, ver nos seus olhos o reflexo das palavras: “**eu acredito em ti, tu consegues**”.

Quero ainda agradecer por último, e não menos primordial, à banda filarmónica Ilhense e a todos os seus executantes, pelos bons momentos de companheirismo, amizade, pelo tempo indefinido a partilhar música e por fazerem-me perder a noção do tempo nas 3 horas de ensaio semanais. Com o tempo aprendi que a música é o melhor refúgio da alma.

A todos o meu mais sincero e de coração: **OBRIGADA!**

## palavras-chave

Stress oxidativo, glicosfingolípidos, reação de Fenton, radical hidroxilo, produtos de oxidação, espectrometria de massa.

## resumo

O *stress* oxidativo está associado ao envelhecimento e a inúmeras patologias, nomeadamente a doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, e a diversos outros fatores. O *stress* oxidativo leva à oxidação de importantes biomoléculas como os lípidos e, ao contrário da maior parte dos produtos de oxidação de fosfolípidos e ácidos gordos insaturados (PUFAS), os produtos de oxidação de glicosfingolípidos (GSLs) têm sido escassamente estudados. Os glicosfingolípidos são moléculas muito diversificadas estruturalmente e com importantes funções, essencialmente no sistema nervoso central (SNC) onde estão localizados maioritariamente. Deste modo, alterações na estrutura dos GSLs conduzirão a consequente comprometimento das suas funções e ao possível desenvolvimento de patologias. Assim para identificar as modificações oxidativas que ocorrem em glicosfingolípidos e pressupor consequentes efeitos biológicos nas células sob *stress* oxidativo, prepararam-se sistemas modelo biomiméticos com diferentes GSLs os quais foram expostos a radicais hidroxilo gerados sob condições da reação de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ) e as reações foram monitorizadas por diferentes metodologia utilizando a espectrometria de massa. Os resultados obtidos com este estudo permitiram-nos identificar vários produtos de oxidação produzidos durante a oxidação desta classe de lípidos. Os produtos de oxidação observados em comum, em todos os GSLs estudados (C16:0GalCer, C24:1GalCer, C24:1LacCer e GM1) foram as suas correspondentes ceramidas. Estas atuam como agentes pro-apoptóticos e podem *in vivo* promover a neurodegeneração nas células sob *stress* oxidativo. Também foi possível observar produtos com inserção de oxigénio junto às duplas ligações ou na cadeia de esfingosina (no caso do GM1) ou na cadeia de ácido gordo monoinsaturada (no caso da C24:1GalCer, C24:1LacCer), corroborando o facto de que ácidos gordos saturados não são susceptíveis à oxidação por radicais. Interessantemente em ambos os GSLs de cadeias glicosiladas compostas com mais de um açúcar (C24:1LacCer e GM1) observou-se a despolimerização oxidativa da porção glicosilada por quebra das correspondentes ligações glicosídicas. Esta degradação leva à formação de GlcCer no caso de oxidação de LacCer ou na formação de outros gangliósidos (GM2, GM3, asialoGM1 e asialoGM2) e glicolípidos (LacCer e GlcCer), no caso de oxidação de GM1. A formação por via radicalar não enzimática destes GSLs leva a distúrbios no perfil lipídico. Previamente, em certas doenças, foram observadas variações na concentração do perfil de gangliósidos e de ceramidas. Estes dados permitem sugerir que em células em condições de *stress* oxidativo, a acumulação de gangliósidos mais simples e ceramidas poderá ter uma contribuição de produtos da degradação oxidativa dos gangliósidos e GSLs mais complexos. Este trabalho contribui assim para uma melhor compreensão das modificações estruturais que ocorrem em alguns glicosfingolípidos em condições de *stress* oxidativo. Os produtos de oxidação aqui identificados suportam a sua possível futura deteção em sistemas biológicos.

## keywords

Oxidative stress, glycosphingolipids, Fenton reaction, hydroxyl radical, oxidation products, mass spectrometry

## abstract

The oxidative stress is associated with aging, with many pathologies, including neurodegenerative and cardiovascular diseases and with several other factors. Oxidative stress leads to oxidation of important biomolecules such as lipids. Unlike most of the phospholipids and unsaturated fatty acid (PUFAS) oxidation products, the glycosphingolipids oxidation products have been scarcely addressed. The glycosphingolipids (GSLs) are a class of lipids with high structural diversity and have important functions, namely in central nervous system (CNS) where they are major components. Thus, alterations in GSLs structure will lead to consequent impairment of its functions and the possible development of pathologies. In this context, to identify the oxidative modifications that occur in glycosphingolipids and presumed consequent biologic effects in cells under oxidative stress, biomimetic model systems with different GSLs were used and exposed to hydroxyl radical produced under Fenton reaction conditions ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ), the reactions were monitored by mass spectrometric techniques. The obtained results allowed to identify several oxidation products generated during the oxidation of this lipidic class. Ceramides were detected as oxidation products for all studied GSLs (C16:0GalCer, C24:1GalCer, C24:1LacCer and GM1). Interestingly, ceramides are pro-apoptotic agents, so they can promote neurodegeneration *in vivo* in cells under oxidative stress. Also it was possible to observe products formed by the addition of oxygen atoms in the vicinity of the double bond whether in sphingosine backbone (in case of GM1) or in monounsaturated fatty acid chain (in case of C24:1GalCer and C24:1LacCer), corroborating the hypothesis that saturated fatty acids don't are susceptible to radical oxidation. Interestingly, in both GSLs with glycosylated chains composed with more than one sugar (C24:1LacCer and GM1) it was possible to observe the oxidative depolymerization of glycan linked to ceramide through cleavage of the corresponding glycosidic bonds. It allowed us to suggest that in cells under oxidative stress, where previously were observed variations in concentration of normal content of the gangliosides and ceramides namely in certain neurodegenerative diseases, it is possible that change in GSL profile can have the contribution of oxidative stress. In fact, this contribution can be associated with the non-enzymatic oxidative degradation of more complex gangliosides in simple gangliosides and ceramides. This work contributes to a better understanding of the fate of some glycosphingolipids under conditions of oxidative stress. The oxidation products here identified support their possible future detection in biological systems.

## Publicações

### Publicações em Revistas Científicas Internacionais com Referee:

**Daniela Couto**, Deolinda Santinha, Tânia Melo, Emanuel Ferreira-Fernandes, Romeu A Videira, Ana Campos, Margarida Fardilha, Pedro Domingues, M Rosário M Domingues: *Glycosphingolipids and oxidative stress: evaluation of hydroxyl radical oxidation of galactosyl and lactosylceramides using mass spectrometry*. Chemistry and Physics of Lipids 2015; 191:106-14. DOI:10.1016/j.chemphyslip.2015.08.014

**Daniela Couto**, Tânia Melo, Elisabete Maciel, Ana Campos, Eliana Alves, M. Rosário M. Domingues, Pedro Domingues: *New insights on non-enzymatic oxidation of ganglioside GM1 using mass spectrometry based approach*. Será submetido em Dezembro de 2015.



**Abstracts de Comunicações  
em Encontros Científicos**

**Daniela Couto**, Tânia Melo, Elisabete Maciel, Pedro Domingues, M. Rosário M. Domingues: *Glycosphingolipids and oxidative stress: evaluation of free radical oxidation of GM1 using mass spectrometry*. 7th Biochemistry Day, University of Aveiro; 04/2015.

Deolinda Santinha, Emanuel Fernandes, Tânia Melo, **Daniela Couto**, Eduarda Silva, Elisabete Maciel, Pedro Domingues, M. Rosário M. Domingues: *Glycosphingolipids and oxidative stress: evaluation of free radical oxidation of galactosyl and lactosylceramides using mass spectrometry*. *Sphingolipids in health and disease*, IBMC University of Porto; 09/2014



# Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABELAS.....	VI
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	VII
LISTA DE SIGLAS.....	VIII
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>STRESS OXIDATIVO</i> .....	3
1.1.1. <i>Formação das espécies reativas de oxigénio</i> .....	4
1.1.2. <i>Oxidação de lípidos</i> .....	7
1.2. ESFINGOLÍPIDOS COMO UMA CLASSE ESPECÍFICA DE LÍPIDOS .....	13
1.2.1. <i>Diversidade estrutural e nomenclatura dos esfingolípídeos</i> .....	13
1.2.2. <i>Biossíntese dos esfingolípídeos</i> .....	17
1.3. LOCALIZAÇÃO E FUNÇÃO DOS GLICOSFINGOLÍPIDOS .....	20
1.3.1. <i>Esfingolípídeos como constituintes de membranas plasmáticas</i> .....	20
1.3.2. <i>Função dos glicosfingolípídeos como moléculas imunoregulatórias</i> .....	22
1.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA NA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE GLICOSFINGOLÍPIDOS NATIVOS E SOB OXIDAÇÃO .....	26
1.4.1. <i>Espectrometria de massa (MS)</i> .....	28
1.4.1.1. <i>Fonte de ionização por electrospray (ESI)</i> .....	29
1.4.2. <i>Espectrometria de massa tandem (MS/MS)</i> .....	31
1.4.3. <i>Cromatografia Líquida</i> .....	34
1.5. OBJETIVOS.....	36
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
2.1. REAGENTES.....	39
2.2. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS .....	39
2.2.1. <i>Glicosfingolípídeos (Galactosilceramida e lactosilceramida)</i> .....	39
2.2.2. <i>Monogangliósido 1 (GM1)</i> .....	40
2.3. OXIDAÇÃO DOS GLICOSFINGOLÍPIDOS E DO GM1 VIA REAÇÃO DE FENTON.....	40
2.4. ESPECTROMETRIA DE MASSA NO MODO POSITIVO PARA OS GSLs.....	40
2.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA-ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM .....	41
2.6. ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM COM UM ANALISADOR Q.EXACTIVE ORBITRAP, NO MODO NEGATIVO, PARA O GM1 .....	42
<b>3. GLICOSFINGOLÍPIDOS E <i>STRESS</i> OXIDATIVO: ESTUDO DA OXIDAÇÃO, VIA RADICAL HIDROXILO, DE GALACTOSIL E LACTOSILCERAMIDAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....</b>	<b>47</b>
3.1. RESULTADOS.....	47
3.1.1. <i>Espectrometria de massa de ionização por Electrospray na análise de galactosil e lactosilceramidas não oxidadas e oxidadas</i> .....	47
3.1.2. <i>Análise por espectrometria de massa tandem da galactosilceramida e lactosilceramida não oxidada e oxidada</i> .....	53
3.2. DISCUSSÃO .....	58
3.3. CONCLUSÕES .....	61

<b>4. AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA DO GM1 UTILIZANDO UMA ABORDAGEM BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO .....</b>	<b>65</b>
4.1. RESULTADOS.....	65
4.1.1. <i>Espectrometria de massa de ionização por electrospray na análise do GM1 não modificado e oxidado</i> 65	
4.1.2. <i>Espectrometria de massa Tandem na análise dos produtos de oxidação observados em ESI-MS do GM1 sob oxidação radicalar .....</i>	<i>73</i>
4.2. DISCUSSÃO .....	82
4.3. CONCLUSÕES .....	86
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>89</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## Índice de figuras

### Capítulo 1.

<b>FIGURA 1-1:</b> COMPOSIÇÃO DE UMA MEMBRANA PLASMÁTICA, COM OS GLICOSFINGOLÍPIDOS PRESENTES EM RAFTS LIPÍDICOS [11].	2
<b>FIGURA 1-2:</b> FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO NA MITOCÔNDRIA, REACÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE (NOS) E REACÇÃO DA CATALASE NO PEROXISSOMA. ASSIM COMO OS OUTROS MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE [36].	5
<b>FIGURA 1-3:</b> REACÇÃO DE FENTON [38–40].	6
<b>FIGURA 1-4:</b> REACÇÃO CATALISADA PELA GLUTATIONA PEROXIDASE E A GLUTATIONA REDUTASE.	6
<b>FIGURA 1-5:</b> VIAS ANTIOXIDANTES E VIAS OXIDATIVAS COM ALGUNS DOS PRODUTOS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA UTILIZADOS COMO BIOMARCADORES DE <i>STRESS</i> OXIDATIVO [4].	8
<b>FIGURA 1-6: RESUMO DA REACÇÃO RADICALAR DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA:</b> ESTA REACÇÃO INICIA-SE PELA REMOÇÃO DE UM HIDROGÉNIO PELO RADICAL HIDROXILO, UM DOS ROS MAIS REACTIVOS, ORIGINANDO O RADICAL ALQUILO LIPÍDICO. ESTE POR SUA VEZ LEVA À FORMAÇÃO DO RADICAL ALQUOXILO $LO^{\bullet}$ QUE PODE SOFRER CISÃO E ORIGINAR PRODUTOS RADICAIS E CARBONILOS, COM PRODUTOS DISTINTOS VIA (A) E (B) [54].	10
<b>FIGURA 1-7:</b> EPOXIDAÇÃO DA LIGAÇÃO DUPLA DE ESFINGOLÍPIDOS PELO RADICAL PEROXILO ( $LOO^{\bullet}$ ) E HIDRÓLISE DO RESPECTIVO EPÓXI [53].	11
<b>FIGURA 1-8:</b> FORMAÇÃO DO DERIVADO EPÓXI DO ÁCIDO OLEICO PELO RADICAL $LOO^{\bullet}$ [53].	11
<b>FIGURA 1-9:</b> FRAGMENTAÇÃO DA GLUCOSILCERAMIDA PELOS RADICAIS HIDROXILO POR UM MECANISMO RADICALAR COM RADICAIS CENTRADOS EM C2 NO RESÍDUO DE GLUCOSE, COM R A CORRESPONDER À CERAMIDA E Z AO RESTO DO RESÍDUO DE GLUCOSE [12].	12
<b>FIGURA 1-10:</b> AS BASES ESFINGÓIDES: ESFINGANINA “D18:0”, ESFINGOSINA “D18:1” E FITOESFINGOSINA “T18:0” [61].	14
<b>FIGURA 1-11:</b> ESTRUTURA MOLECULAR DA CERAMIDA EM QUE O GRUPO HIDROXILO PRIMÁRIO ESTÁ SINHALIZADO A VERMELHO [58].	15
<b>FIGURA 1-12: EXEMPLOS DE GRUPOS CABEÇA DE GLICOSFINGOLÍPIDOS [60].</b> A GLUCOSILCERAMIDA (GlcCer) É COMPOSTA POR UMA CERAMIDA (Cer) LIGADA A UM RESÍDUO DE GLUCOSE (Glc); A LACTOSILCERAMIDA (LacCer) É CONSTITUÍDA PELA CER E DOIS HIDRATOS DE CARBONO, COM O RESÍDUO DE Glc (I) LIGADO AO GRUPO HIDROXILO DA CER E O RESÍDUO DE GALACTOSE (II) (Gal) LIGADA AO RESÍDUO DE Glc (I); O MONOGLANGLIÓSIDO 3 (GM3) TEM UMA CER LIGADA A UM RESÍDUO DE Glc (I), QUE POR SUA VEZ ESTÁ LIGADO AO RESÍDUO DE Gal (II) E ESTE A UM RESÍDUO DE ÁCIDO N-ACETIL NEURAMÍNICO (NeuAc); O MONOGLANGLIÓSIDO 2 (GM2) É COMPOSTO PELO MESMO GRUPO CABEÇA QUE O GM3 MAS COM UM RESÍDUO A MAIS DE N-ACETIL GALACTOSAMINA (III) (GalNAc) LIGADO TAMBÉM AO RESÍDUO DE Gal (II) COMO O RESÍDUO DE NeuAc; O MONOGLANGLIÓSIDO (GM1a) COMPOSTO PELO MESMO GRUPO CABEÇA QUE O GM2 MAS COM UM RESÍDUO A MAIS DE Gal (IV) LIGADO AO RESÍDUO DE GalNAc (III).	16
<b>FIGURA 1-13:</b> O ESQUEMA DE BIOSÍNTESE DOS GLICOSFINGOLÍPIDOS E SUAS ESTRUTURAS [11].	17
<b>FIGURA 1-14:</b> IMAGEM REPRESENTATIVA DA BIOSÍNTESE DE ESFINGOLÍPIDOS [67].	20
<b>FIGURA 1-15:</b> COMPLEXO CD1-GLICOLÍPIDO EM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTIGÉNIOS (APCs) LIGADO AO RECETOR DAS CÉLULAS T (TCR), IMAGEM ADAPTADA DO ARTIGO [21].	24
<b>FIGURA 1-16: MECANISMO DE ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS INKT SOBRE INFECÇÃO MICROBIAL.</b> (A) -ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS INKT ATRAVÉS DO SEU RECETOR TCR QUE RECONHECE OS LÍPIDOS DE MICRÓBIOS LIGADOS AOS RECETORES CD1D. (B) - ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS INKT POR CITOCINAS INFLAMATÓRIAS OU PELAS CITOCINAS EM CONJUNTO COM A ALTERAÇÃO DE LÍPIDOS <i>SELF</i> PRODUZIDOS POR APCs, AQUANDO DA LIGAÇÃO DE APCs COM OS RECETORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES (PRRs). ESTES LÍPIDOS <i>SELF</i> PRODUZIDOS PELAS APCs SÃO TAMBÉM RECONHECIDOS PELOS RECETORES CD1D [22].	25
<b>FIGURA 1-17:</b> CONCEITOS FUNDAMENTAIS DA ESPECTROMETRIA DE MASSA [83].	28
<b>FIGURA 1-18:</b> REPRESENTAÇÃO DA IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY [89].	29
<b>FIGURA 1-19:</b> CONCEITOS FUNDAMENTAIS DA ESPECTROMETRIA DE MASSA TANDEM [83].	31
<b>FIGURA 1-20:</b> O IÃO PRODUTO CARACTERÍSTICO DE TODOS OS ESFINGOLÍPIDOS CONSTITUÍDOS PELA ESFINGOSINA COMO A SUA BASE ESFINGÓIDE, COMO RESULTADO DE MS/MS NO MODO POSITIVO DE ESFINGOLÍPIDOS COMO IÕES $[M+H]^+$ . IÃO PRODUTO DE $m/z$ 264, CORRESPONDENTE À ESFINGOSINA DESIDRATADA (MENOS DUAS MOLÉCULAS DE ÁGUA).	32

<b>FIGURA 1-21: PERDAS NEUTRAS CARACTERÍSTICAS DOS GLICOSFINGOLÍPIDOS, COMO RESULTADO DE MS/MS NO MODO POSITIVO DE IÕES <math>[M+H]^+</math>.</b> PARA CEREBRÓSIDOS, COM APENAS UM RESÍDUO DE AÇÚCAR, PERDA NEUTRA DE $HEX_{RES}$ (-162 DA), $HEX$ (-180 DA); PARA $HEX_N$ CER ( $N \geq 2$ ) SÃO OBSERVADAS AS MESMAS PERDAS NEUTRAS QUE PARA OS CEREBRÓSIDOS E ADICIONALMENTE PERDAS NEUTRAS DE $HEX-HEX_{RES}$ (-324 DA), $HEX-HEX$ (-342 DA).....	33
<b>FIGURA 1-22: IÕES PRODUTO CARACTERÍSTICOS DOS GLICOSFINGOLÍPIDOS, COMO RESULTADO DE MS/MS NO MODO POSITIVO DE IÕES <math>[M+NA]^+</math>.</b> OS IÕES PRODUTO CARACTERÍSTICOS DOS CEREBRÓSIDOS, COM APENAS UM RESÍDUO DE AÇÚCAR, SÃO: $[HEX_{RES}+NA]^+$ (DE M/Z 185 DA) E $[HEX+NA]^+$ (DE M/Z 203 DA); POR SUA VEZ OS IÕES PRODUTO CARACTERÍSTICOS DAS $HEX_N$ CER ( $N \geq 2$ ) SÃO OS MESMOS IÕES PRODUTO E AINDA OS: $[HEX-HEX_{RES}+NA]^+$ (DE M/Z 347 DA), $[HEX-HEX+NA]^+$ (DE M/Z 365 DA).....	33
<b>FIGURA 1-23: IÃO PRODUTO E PERDA NEUTRA CARACTERÍSTICA DOS GANGLIÓSIDOS, COMO RESULTADO DE MS/MS NO MODO NEGATIVO DE IÕES <math>[M-H]^-</math> E <math>[M-2H]^{2-}</math>.</b> IÃO PRODUTO $[NEUAC_{RES}-H]^-$ DE M/Z 290 E PERDA NEUTRA DO $NEUAC_{RES}$ (-291 DA).....	34

## Capítulo 3.

<b>FIGURA 3-1: ESTRUTURA MOLECULAR DAS GALACTOSIL- E LACTOSILCERAMIDAS ESTUDADAS.</b> (A_A1) D-GALACTOSIL- $\beta$ -1,10 N-PALMITOIL-D-ERITRO-ESFINGOSINA (C16GALCER; d18:1/16:0); (A_A2) D-GALACTOSIL- $\beta$ -1,10 N-NERVONOIL-D-ERITRO-ESFINGOSINA (C24:1GALCER; d18:1/24:1(15Z)); E (B_B1) D-LACTOSIL- $\beta$ -1,10 N-NERVONOIL-D-ERITRO-ESFINGOSINA (C24:1LACCER; d18:1/ 24:1(15Z)). .....	48
<b>FIGURA 3-2: MONITORIZAÇÃO DA OXIDAÇÃO INDUZIDA PELO RADICAL HIDROXILO DE GALACTOSIL E LACTOSILCERAMIDAS POR QTOF-ESI-MS.</b> COMPARAÇÃO DO ESPECTRO DE MASSA DE ESI-MS DA C16:0GALCER (A1), C24:1 GALCER (B1) E C24:1 LACCER (C1) NÃO OXIDADA E APÓS A OXIDAÇÃO COM IDENTIFICAÇÃO DAS CORRESPONDENTES ESPÉCIES OXIDADAS C16:0 GALCER (A2), C24:1 GALCER (B2) E C24:1 LACCER (C2) FORMADAS SOB CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE FENTON ( $H_2O_2/Fe^{2+}$ ). .....	49
<b>FIGURA 3-3: ANÁLISE LC-MS DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA C24:1GALCER E C24:1LACCER.</b> (A) CROMATOGRAMAS RECONSTRUÍDOS DOS IÕES $[C24:1GALCER + H]^+$ DE M/Z 810.3 DESIGNADO COMO GALCER NÃO MODIFICADA, $[C24:1GALCER + O-2DA + H]^+$ DE M/Z 824.8 DESIGNADO COMO DERIVADO CETO, $[C24:1GALCER + O + H]^+$ DE M/Z 826.8 QUE CORRESPONDE AO DERIVADO HIDROXI E $[C24:1GALCER + 2O + H]^+$ DE M/Z 842.6 QUE CORRESPONDE AO DERIVADO HIDROPEROXI. (B) CROMATOGRAMAS RECONSTRUÍDOS DOS IÕES $[C24:1LACCER + H]^+$ DE M/Z 972.8 DESIGNADO COMO LACCER NÃO MODIFICADA, $[C24:1LACCER + O-2DA + H]^+$ DE M/Z 986.8 DESIGNADO COMO DERIVADOS CETO, $[C24:1LACCER + O + H]^+$ DE M/Z 988.7 QUE CORRESPONDE AOS DERIVADOS HIDROXI, $[C24:1LACCER + 2O + H]^+$ DE M/Z 1004.7 QUE CORRESPONDE AOS DERIVADOS HIDROPEROXI, $[C24:1GLUCER + H]^+$ DE M/Z 810.3 DESIGNADO COMO DERIVADO GLUCOSILCERAMIDA. *CONTRIBUIÇÃO DOS IÕES CORRESPONDENTES AOS DERIVADOS CETO DA GALCER. V0, VOLUME MORTO.....	52
<b>FIGURA 3-4: ESPECTROS DE LC-MS/MS DOS IÕES <math>[M + H]^+</math>, <math>[M + NA]^+</math> E DERIVADOS HIDROPEROXI DA C24:1 GALCER OXIDADA.</b> ESPECTRO LC-MS/MS DO IÃO $[C24:1GALCER + H]^+$ DE M/Z 810.3 (A1) E DA CORRESPONDENTE ESPÉCIE OXIDADA: IÃO $[C24:1GALCER + 2O + H]^+$ DE M/Z 842.6 (A3). ESPECTRO LC-MS/MS DO IÃO $[C24:1GALCER + NA]^+$ DE M/Z 832.7 (A2) E DA CORRESPONDENTE ESPÉCIE OXIDADA: IÃO $[C24:1GALCER + 2O + NA]^+$ DE M/Z 864.7 (A4). *ESTRUTURA PROPOSTA NA FIGURA 7. ....	52
<b>FIGURA 3-5: ESPECTROS DE LC-MS/MS DOS IÕES <math>[M + NA]^+</math> DA C24:1GALCER E SEUS DERIVADOS OXIDADOS.</b> ESPECTRO DE ESI-MS/MS OBTIDO NO INSTRUMENTO Q-TOF- DOS IÕES $[C24:1GALCER + NA]^+$ DA C24:1 GALCER DE M/Z 832.7 (A1) E CORRESPONDENTES ESPÉCIES OXIDADAS: $[C24:1GALCER + O - 2DA + NA]^+$ DE M/Z 846.6 (A2), $[C24:1GALCER + O + NA]^+$ DE M/Z 848.7 (A3), $[C24:1GALCER + 2O + NA]^+$ DE M/Z 864.7 (A4). *ESTRUTURAS PROPOSTAS NA FIGURA 7 (B). .....	54
<b>FIGURA 3-6: ESPECTROS DE LC-MS/MS DOS IÕES <math>[M + H]^+</math>, <math>[M + NA]^+</math> E DERIVADOS HIDROPEROXI DA C24:1 LACCER OXIDADA.</b> ESPECTRO LC-MS/MS DO IÃO $[C24:1LACCER + H]^+$ DE M/Z 972.8 (A1) E DA CORRESPONDENTE ESPÉCIE OXIDADA: IÃO $[C24:1LACCER + 2O + H]^+$ DE M/Z 1004.7 (A3). ESPECTRO LC-MS/MS DO IÃO $[C24:1LACCER + NA]^+$ DE M/Z 994.7 (A2) E DA CORRESPONDENTE ESPÉCIE OXIDADA: IÃO $[C24:1LACCER + 2O + NA]^+$ DE M/Z 1026.7 (A4). *ESTRUTURA PROPOSTA NA FIGURA 7 (B). .....	55
<b>FIGURA 3-7: IÕES PRODUTO OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE MASSA TANDEM DA C24:1GALCER OXIDADA E C24:1LACCER OXIDADA COM A OXIDAÇÃO NA RESPECTIVA CADEIA DE ÁCIDO GORDO</b> (A) IÕES PRODUTO OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE MS/MS DOS IÕES $[M + H]^+$ DOS DERIVADOS CETO, HIDROXI E HIDROPEROXI DA GALCER/LACCER FORMADOS PELA QUEBRA DA LIGAÇÃO C2-N. (B) IÕES PRODUTO OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE MS/MS DOS IÕES $[M + NA]^+$ DOS DERIVADOS	

CETO, HIDROXI E HIDROPEROXI DA GALCER/LACER. PROPOSEMOS A FORMAÇÃO DESTAS ESTRUTURAS PELA PERDA COMBINADA DA CADEIA DE HIDRATOS DE CARBONO E A QUEBRA DA LIGAÇÃO C3–C4 DA CADEIA DE ESFINGOSINA. ....	57
<b>FIGURA 3-8: VIAS DE FRAGMENTAÇÃO DOS DERIVADOS HIDROPEROXI DA C24:1 GALACTOSILCERAMIDA E C24:1 LACTOSILCERAMIDA.</b> (A) VIAS DE FRAGMENTAÇÃO ENVOLVENDO A PERDA DE GAL E LAC DOS IÕES $[M + 2O + Na]^+$ DERIVADOS HIDROPEROXI DA C24:1 GALCER (DE $m/z$ 864.7) E C24:1 LACER (DE $m/z$ 1026.7); (B) FRAGMENTAÇÃO NA PROXIMIDADE DO GRUPO HIDROPEROXI DA C24:1 GALCER E C24:1 LACER. OS QUATRO ISÔMEROS CORRESPONDENTES À OXIDAÇÃO NA CADEIA C24:1 DE ÁCIDO GORDO ESTÃO AQUI REPRESENTADOS (B1–B4). IÕES DE $m/z$ 748.7/ 910.7 (B1), $m/z$ 708.6/870.7 (B2), 734.6/896.7 (B3) E $m/z$ 722.6/884.7 (B4) QUE CORRESPONDEM À COMBINADA QUEBRA DAS LIGAÇÕES ENTRE C18–C17, C15–C14, C17–C16 E C16–C15, E, À FORMAÇÃO DE UM TERMINAL ALDEÍDO PERMITINDO-NOS PROPOR A PRESENÇA DO HIDROPEROXI EM C17, C14, C16 E C15, RESPECTIVAMENTE.....	59
 <b>Capítulo 4.</b>	
<b>FIGURA 4-1: ESTRUTURA MOLECULAR DAS DUAS ESPÉCIES MOLECULARES DE GM1 PRESENTES NO PADRÃO DE GM1.</b> (A) GM1(d18:1/C18:0) (NEU5AcA2-3(GALB1-3GALNACB1-4)GALB1-4GLCB1CER) E (B) GM1(d20:1/C18:0) COM R <sup>1</sup> A CORRESPONDER À CADEIA DE HIDRATOS DE CARBONO (NEU5AcA2-3(GALB1-3GALNACB1-4)GALB1-4GLCB1).....	66
<b>FIGURA 4-2: OXIDAÇÃO DO GM1 INDUZIDA POR RADICAIS HIDROXILO E MONITORIZADA POR ESI-MS.</b> COMPARAÇÃO DO ESPECTRO DE MASSA ESI DO GM1 NÃO OXIDADO (A1), E GM1 OXIDADO (A2) EM QUE A OXIDAÇÃO FOI INDUZIDA POR RADICAIS HIDROXILO PRODUZIDOS, EM CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE FENTON ( $H_2O_2/Fe^{2+}$ ). ....	69
<b>FIGURA 4-3: ANÁLISE EM LC-MS DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DO GM1.</b> CROMATOGRAMAS RECONSTRUÍDOS DOS IÕES DE $[GM1(d18/C18:0)-H]^-$ DE $m/z$ 1544.9 DESIGNADOS COMO O GM1 NÃO MODIFICADO, DE $[GM1(d18/C18:0)+O-2Da-H]^-$ DE $m/z$ 1558.9 DESIGNADOS COMO OS DERIVADOS CETO DO GM1, DE $[GM1(d18/C18:0)+O-H]^-$ DE $m/z$ 1560.9 DESIGNADOS COMO OS DERIVADOS HIDROXI DO GM1, DE $[GM2(d18/C18:0)-H]^-$ DE $m/z$ 1382.8 DESIGNADOS COMO O GM2 NÃO MODIFICADO, DE $[GM1(d3^{COOH}/C18:0)-H]^-$ (DE $m/z$ 1350.6) RESULTANTES DA QUEBRA OXIDATIVA DA CADEIA DE ESFINGOSINA ENTRE C3-C4 COM FORMAÇÃO DE UM ÁCIDO CARBOXÍLICO EM C3, DE $[GM1(d2^{CH2OH}/C18:0)-H]^-$ (DE $m/z$ 1322.6) RESULTANTES DA QUEBRA OXIDATIVA DA CADEIA DE ESFINGOSINA ENTRE C2-C3 COM FORMAÇÃO DE UM GRUPO HIDROXILO EM C2. POR ÚLTIMO, OS RICs DOS GLICANOS: $[GLICANO-H]^-$ DE $m/z$ 997.3 DESIGNADOS COMO O GLICANO NÃO MODIFICADO, E $[GLICANO-HEX_{res}-H]^-$ DESIGNADOS COMO O GLICANO NÃO MODIFICADO MENOS UM RESÍDUO DE HEXOSE. *CONTRIBUIÇÃO DOS IÕES CORRESPONDENTES AOS DERIVADOS CETO DO GM1. VO, VOLUME MORTO. ....	73
<b>FIGURA 4-4: OS ESPECTROS DE MS/MS DO GM1 NÃO MODIFICADO E DOS SEUS DERIVADOS OXIGENADOS.</b> (A) ESPECTRO DE MS/MS DO $[M-H]^-$ GM1 NÃO MODIFICADO DE $m/z$ 1544.9 E SUAS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO. (B). ESPECTRO DE MS/MS DO $[M-H]^-$ DO DERIVADO CETO DO GM1 COM $m/z$ 1558.8 E SEUS TRÊS POSSÍVEIS ISÔMEROS POSICIONAIS PROPOSTOS NA CADEIA DE HIDRATOS DE CARBONO: ESPECIFICAMENTE COM O GRUPO CETO NOS RESÍDUOS DE GAL (IV) E/OU GALNAC (III) (B-Xb) E NO RESÍDUO DE GLC (I) (B-Yb). (C) ESPECTRO DE MS/MS DO $[M-H]^-$ DO DERIVADO HIDROXI DO GM1, DE $m/z$ 1560.9 E SUAS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO COM A PROPOSTA DO GRUPO HIDROXILO LOCALIZADO NA CERAMIDA (C). ....	76
<b>FIGURA 4-5: OS ESPECTROS DE MS/MS DO GM2 NÃO MODIFICADO E DOS SEUS DERIVADOS OXIGENADOS.</b> (A) ESPECTRO DE MS/MS DO $[M-H]^-$ GM2 NÃO MODIFICADO DE $m/z$ 1382.8 E SUAS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO. (B) ESPECTRO DE MS/MS DO $[M-H]^-$ DO DERIVADO CETO DO GM2 COM $m/z$ 1396.8 E SEUS DOIS POSSÍVEIS ISÔMEROS POSICIONAIS PROPOSTOS NA CADEIA DE HIDRATOS DE CARBONO: ESPECIFICAMENTE COM O GRUPO CETO NOS RESÍDUOS DE GALNAC (III) (B-Xb) E NO RESÍDUO DE GLC (I) (B-Yb). (C) ESPECTRO DE MS/MS DO $[M-H]^-$ DO DERIVADO HIDROXI DO GM2, DE $m/z$ 1398.8 E SUAS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO COM A PROPOSTA DO GRUPO HIDROXILO LOCALIZADO NA CERAMIDA (C).....	77
<b>FIGURA 4-6: OS ESPECTROS DE MS/MS DOS PRODUTOS FORMADOS DEVIDO À QUEBRA OXIDATIVA DA CADEIA DE HIDRATOS DE CARBONO DO GM1.</b> ESPECTROS DE MS/MS DO GM1 (A1), ASIALOGM1 (GM1- NEUAc <sub>res</sub> ) (A2), GM2 (B1) ASIALOGM2 (GM2- NEUAc <sub>res</sub> ) (B2), GM3 (C1) E LACER (GM3-NEUAc <sub>res</sub> ) (C2). ....	79
<b>FIGURA 4-7: OS ESPECTROS DE MS/MS DOS PRODUTOS FORMADOS DEVIDO À QUEBRA OXIDATIVA ENTRE C3–C4 DA CADEIA DE ESFINGOSINA DO GM1 E GM2 COM GRUPO TERMINAL -COOH.</b> OS ESPECTROS DE MS/MS DOS DERIVADOS GM1 DESIGNADOS COMO IÕES DE CARGA UNITÁRIA $[GM1(d3^{COOH}/C18:0)-H]^-$ (A) E IÕES DE CARGA DUPLA $[GM1(d3^{COOH}/C18:0)-2H]^{2-}$ (A1). OS ESPECTROS DE MS/MS DOS DERIVADOS DE GM2 DESIGNADOS COMO IÕES DE CARGA UNITÁRIA $[GM2(d3^{COOH}/C18:0)-H]^-$ (B) E IÕES DE CARGA DUPLA $[GM2(d3^{COOH}/C18:0)-2H]^{2-}$ (B1). ....	82

## Índice de tabelas

### Capítulo 3.

<b>TABELA 3-1: PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DE GALACTOSIL- E LACTOSILCERAMIDAS DETETADOS POR ESI-MS. TODOS OS IÕES IDENTIFICADOS SÃO DESIGNADOS COM OS SEUS RESPECTIVOS VALORES DE <math>M/Z</math>.</b>	50
<b>TABELA 3-2: MEDIÇÃO DAS MASSAS EXACTAS DOS NOVOS IÕES DETECTADOS, POR ESI-MS, APÓS OXIDAÇÃO. TODOS OS IÃOS SÃO DESIGNADOS COM A SUA FÓRMULA PREVISTA, MASSA OBSERVADA, MASSA CALCULADA E ERRO DE MASSA MEDIDA....</b>	51
<b>TABELA 3-3: PRINCIPAIS IÕES PRODUTO OBSERVADOS NOS ESPECTROS LC-MS/MS DOS IÕES <math>[M+H]^+</math> DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA C24:1GALCER E C24:1LACER COM A INDICAÇÃO DOS VALORES DE <math>M/Z</math> E AS CORRESPONDENTES VIAS DE FRAGMENTAÇÃO MAIS PROVÁVEIS. <sup>^</sup> ESTRUTURA IDENTIFICADA NA FIGURA 7 (A).</b>	53
<b>TABELA 3-4: PRINCIPAIS IÕES PRODUTO OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE LC-MS/MS DOS IÕES <math>[M+Na]^+</math> DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DE C24:1GALCER E C24:1 LACER COM A INDICAÇÃO DOS VALORES DE <math>M/Z</math> E AS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO MAIS PROVÁVEIS. <sup>^</sup>ESTRUTURA IDENTIFICADA NA FIGURA 7 (B).</b>	55

### Capítulo 4.

<b>TABELA 4-1: RESUMO DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO, FORMADOS APÓS OXIDAÇÃO DO GM1, E IDENTIFICADOS NOS ESPECTROS DE ESI-MS. NESTA TABELA APRESENTAMOS OS VALORES DE <math>M/Z</math> DOS IÕES <math>[M-H]^-</math> E <math>[M-2H]^{2-}</math> OBSERVADOS, AS ESTRUTURAS MOLECULARES PROPOSTAS E SUAS IDENTIFICAÇÕES MAIS PROVÁVEIS.</b>	67
<b>TABELA 4-2: MEDIÇÃO DAS MASSAS EXACTAS DOS NOVOS IÕES DETECTADOS, POR ESI-MS, APÓS OXIDAÇÃO. TODOS OS IÃOS SÃO DESIGNADOS COM A SUA FÓRMULA PREVISTA, MASSA OBSERVADA, MASSA CALCULADA E ERRO DE MASSA MEDIDA....</b>	71
<b>TABELA 4-3: PRINCIPAIS IÕES PRODUTOS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE ESI-MS/MS DE IÕES <math>[M-H]^-</math> DOS DERIVADOS OXIGENADOS GM1 E GM2, COM A INDICAÇÃO DOS VALORES DE <math>M/Z</math> E AS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO MAIS PROVÁVEIS. ....</b>	78
<b>TABELA 4-4: PRINCIPAIS IÕES PRODUTOS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE ESI-MS/MS DE IÕES <math>[M-H]^-</math> DO GM2, GM3, ASIALOGM1, ASIALOGM2, LACER E GLCER, COM A INDICAÇÃO DOS VALORES DE <math>M/Z</math> E AS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO MAIS PROVÁVEIS.....</b>	79
<b>TABELA 4-5: PRINCIPAIS IÕES PRODUTOS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE ESI-MS/MS DE IÕES <math>[M-H]^-</math> DOS IÕES MOLECULARES QUE SURGIRAM DA QUEBRA DA LIGAÇÃO DA CADEIA DE ESFINGOSINA ENTRE C3-C4 DO GM1, GM2 E ASIALOGM1 COM FORMAÇÃO DE UM GRUPO <math>-COOH</math> TERMINAL, COM A INDICAÇÃO DOS VALORES DE <math>M/Z</math> E AS VIAS DE FRAGMENTAÇÃO MAIS PROVÁVEIS. ....</b>	81



## Índice de esquemas

### Capítulo 4.

<b>ESQUEMA 4-1: MECANISMO RADICALAR PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DOS IÕES, OBSERVADOS NO ESPECTRO DE ESI-MS, QUE SURTIRAM DA QUEBRA DA CADEIA DE ESFINGOSINA ENTRE C2-C3 (A) E ENTRE C3-C4 (B). ....</b>	<b>83</b>
<b>ESQUEMA 4-2: A FORMAÇÃO DE NOVOS GANGLIÓSIDOS, GLICOSFINGOLÍPIDOS E CERAMIDAS ATRAVÉS DE UMA DEGRADAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA DO GM1. NOSSA PROPOSTA PARA A FORMAÇÃO DOS PRODUTOS FORMADOS DEVIDO À QUEBRA OXIDATIVA DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DA CADEIA DE HIDRATOS DE CARBONO DO GM1 PELO RADICAL HIDROXILO, FORMADO POR REAÇÃO DE FENTON. A) -NEUAC<sub>RES</sub>, B) -GAL<sub>RES</sub> (IV), C) -GALNAC<sub>RES</sub> (III), D) -GAL<sub>RES</sub> (II), E) -GLC<sub>RES</sub> (I). ....</b>	<b>85</b>

## Lista de Siglas

AD -Doentes de Alzheimer

ADN -Ácido desoxirribonucleico

APCs -Células apresentadoras de antígenos

Cat -Catião

Cer -Ceramida

CerK -Ceramida cinase

CFE -Ceramida fosfoetanolamina

CGalT -Cer galactosiltransferase

CGlcT -Cer glucosiltransferase

CID -Dissociação induzida por colisão

DES -(dihidro)ceramida desaturase

ESI -Ionização por *electrospray*

FAB -Fast atom bombardment

FT-ICR -cyclotron resonance of Fourier /  
Fourier transform ion cyclotron

Gal -Galactose

GalCer -Galactosilceramida

GalNAc -N-Acetil galactosamina

Gb -série Globo

Gg -série Gânglio

Glc -Glucose

GlcCer -Glucosilceramida

GM -Monogangliósido

GPx -Glutathione peroxidase

GSH -Glutathione reduzida

GSLs -Glicosfingolípido

GSSG -Glutathione dissulfeto

GTs -Glicosiltransferases

HNE -4-hidroxi-2-nonenal

iGb3 -Isoglobotrihexosilceramida

iNKT -Células natural killer T invariantes

LacCer -Lactosilceramida

LC -Cromatografia líquida

Lc -Série Lacto

LC-MS -Cromatografia Líquida acoplada à  
Espectrometria de Massa

LO<sup>•</sup> -Radical alcoxilo

LOO<sup>•</sup> -Radical peroxilo

LOX -Lipoxigenase

LPO -Peroxidação lipídica

MALDI -Matrix-Assisted Laser Desorption  
Ionization

MEG -Microdomínios enriquecidos de  
glicosfingolípido

MPO -Mieloperoxidase

MS -Espectrometria de massa

MS/MS -Espectrometria de massa tandem

NADPH oxidase -Nicotinamida Adenina  
Dinucleotídeo Fosfato oxidase

NeuAc -Ácido N-acetil Neuramínico

NKR -Recetores Natural killer

NKT -Células Natural killer T

NL -Scanning de perdas neutras

nLc - Série Neolacto

NO -Óxido nítrico

NOS -Óxido nítrico sintetase

NPC -Niemann-Pick tipo C

$O_2^{\cdot -}$  -Anião superóxido

$\cdot OH$  -Radical hidroxilo

$ONOO^{\cdot -}$  -Anião peroxinitrito

PLs -Fosfolípidos

PSI -Scanning de iões produto

Q -Quadrupolo

RE -Reticulo endoplasmático

RICs -Cromatogramas reconstruídos de iões

RNS -Espécies reativas de azoto

RONs -Espécies reativas de oxigénio/azoto

ROS -Espécies reativas de oxigénio

SLs -Esfingolípidos

SM -Esfingomielina

SMS -Esfingomielina sintase

SNC -Sistema nervoso central

SNP -Sistema nervoso periférico

SOD -Superóxido dismutase

SPC -Esfingosilfosfocolina

SPT -Serina palmitoil transferase

TCR -Recetores de células T

TEMPO -N-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidina

TLC -Cromatografia de camada fina

TOF -Tempo de voo



---

## Capítulo 1.

---

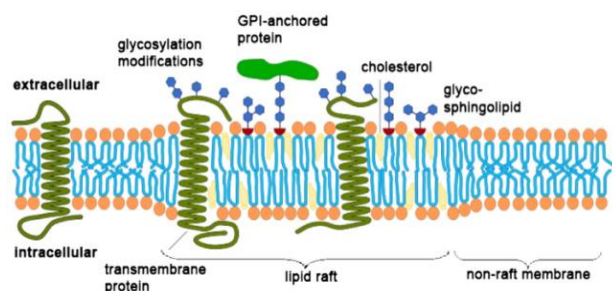
Introdução



## 1. Introdução

O *stress* oxidativo é visto como um desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e o sistema antioxidante. Em condições de *stress* oxidativo observa-se geralmente um aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS) e/ou uma reduzida capacidade de resposta do sistema antioxidante, promovendo a oxidação de biomoléculas essenciais como o ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas e lípidos o que leva a dano de células e de tecidos [1,2]. O *stress* oxidativo tem sido associado a inúmeras patologias, nomeadamente a doenças cardiovasculares e neurodegenerativas [3,4]. As doenças neurodegenerativas surgem também muitas vezes associadas ou como consequência do envelhecimento. Neste contexto, o crescente envelhecimento da população e o aumento da esperança média de vida tem elevado a prevalência das doenças neurodegenerativas, tornando-as, assim, num dos maiores problemas de saúde a nível mundial [5,6]. De enfatizar, que os hábitos de vida, tais como o exercício físico extremo [1], o tabagismo e a obesidade também têm sido associados ao *stress* oxidativo, mais especificamente à exacerbação deste [7]. Todas estas evidências tornam, portanto, fundamental o entendimento do papel da oxidação, sob *stress* oxidativo, nas alterações estruturais de biomoléculas suscetíveis à oxidação. Embora o conhecimento das alterações oxidativas que ocorrem em todas as moléculas biológicas seja importante, considera-se as modificações oxidativas em lípidos particularmente lesivas [8]. Sob condições de *stress* oxidativo, ao contrário da oxidação da maior parte dos lípidos e até de alguns esfingolípids [9], as alterações que ocorrem em glicosfingolípids (GSLs) e as consequências biológicas que resultam da oxidação dos glicosfingolípids são praticamente desconhecidas. Isto deve-se ao facto dos glicosfingolípids serem constituídos maioritariamente por resíduos de ácidos gordos saturados [10] e mono insaturados. Além disso, o carbono redutor dos hidratos de carbono dos GSLs não está livre, pois a ligação entre a cadeia de hidratos de carbono e a ceramida é formada a partir do grupo hidroxilo do C-1 (conhecido como o carbono redutor ou anomérico do hidrato de carbono) [11]. Desta forma, os GSLs foram admitidos como pobres substratos de oxidação [10] e por isso a possibilidade de sua participação em reações de oxidação com radicais livres foi escassamente discutida na literatura. Todavia alguns autores [10,12–15] têm observado que os GSLs são estruturalmente suscetíveis à oxidação e dependentemente do método de oxidação utilizado podem formar-se diferentes produtos de oxidação.

Os glicosfingolípídeos (GSLs) são uma classe de lípidos muito diversificada, que se localizam nas membranas (figura 1), em especial dos glóbulos vermelhos e dos glóbulos brancos, e estão presentes em maiores quantidades nas membranas das células nervosas [16]. Estes lípidos são moléculas anfipáticas, pois são constituídos por uma ceramida (Cer) apolar e uma parte polar constituída por hidratos de carbono [11,17,18]. Estes lípidos localizam-se geralmente no folheto externo da bicamada lipídica das membranas e as suas cadeias de hidratos de carbono estendem-se para o espaço extracelular [18]. Os glicosfingolípídeos exercem inúmeras funções nomeadamente na resposta do sistema imune inato [19–25]. Como componentes de vários tipos de microdomínios, como os *rafts* lipídicos (figura 1), fazem parte integrante da dinâmica da membrana celular, do reconhecimento célula-célula, do crescimento da célula e da transdução de sinal. As funções que cada glicosfingolípídeo desempenha são dependentes da respetiva estrutura do GSL [17,18], deste modo a sua oxidação implicará possíveis perdas ou alterações das suas funções, devido às modificações oxidativas que possam ocorrer a nível estrutural.



**Figura 1-1:** Composição de uma membrana plasmática, com os glicosfingolípídeos presentes em rafts lipídicos [11].

A nível estrutural, os GSLs são altamente específicos tanto para o tipo de espécie animal como para o tipo de tecido [26]. Observou-se ainda que, durante a evolução dos animais, os GSLs mantiveram-se estruturalmente constantes. Em concordância, animais com erros na via da biossíntese dos GSLs apresentam diferentes fenótipos, demonstrando também a importância funcional de uma correta biossíntese dos GSLs para os organismos [27]. Além disso, também foi reportado que durante o desenvolvimento do organismo, assim como na progressão de doenças, as estruturas dos glicosfingolípídeos e os tipos de GSLs mais abundantes no organismo sofrem constante modificação [26]. Na progressão de doenças associadas ao *stress* oxidativo são previstas modificações oxidativas de biomoléculas, entre as quais os glicosfingolípídeos. Existem algumas evidências relevantes



no estudo da oxidação desta subclasse de lípidos, tendo sido previamente descrito que a oxidação poderá levar à formação de glicosfingolípidos oxidados [28] ou mesmo à fragmentação estrutural do correspondente glicosfingolípidio [10,12]. Neste contexto, identificar as alterações que ocorrem na estrutura de diferentes glicosfingolípidos quando sujeitos a oxidação, em condições de reação de Fenton, utilizando técnicas de espectrometria de massa (MS), espectrometria de massa tandem (MS/MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) poderá ser útil na compreensão dos mecanismos bioquímicos subjacentes à oxidação radicalar de GSLs e dos possíveis papéis biológicos dos produtos de oxidação identificados, em organismos sob *stress* oxidativo, ou no desenvolvimento de doenças, em particular das doenças neurodegenerativas.

### **1.1. *Stress oxidativo***

O *stress* oxidativo pode ocorrer em todos os organismos aeróbicos, uma vez que as espécies reativas de oxigénio são produtos da respiração mitocondrial [5]. O *stress* oxidativo nas células e tecidos pode ser definido como um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes (ROS ou espécies reativas de azoto (RNS)) e o sistema antioxidante, onde os fatores pró-oxidantes prevalecem ao sistema antioxidante. O *stress* oxidativo é então causado ou por excesso de formação de ROS ou RNS ou pela redução da capacidade endógena antioxidante [3]. Assim, o *stress* oxidativo está intimamente ligado a quantidades elevadas de pró-oxidantes no organismo [1]. Este aumento significativo tem sido associado aos mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento/senescência celular [29], na inflamação, como em determinadas condições patológicas [1] (embora, por vezes, em algumas destas condições o *stress* oxidativo possa ser visto apenas como um efeito secundário [1]). As doenças às quais o *stress* oxidativo tem sido associado são, entre outras, doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson [29], doenças autoimunes, aterosclerose e carcinogénese [1,30]. Estas doenças surgem com alguma frequência na população e são consideradas, até ao momento, incuráveis. Portanto, o conhecimento dos mecanismos subjacentes ao correspondente desenvolvimento da patologia torna-se cada vez mais importante [1], assim como o(s) possível(eis) papel(eis) do *stress* oxidativo na progressão da mesma pelo que o seu conhecimento pode permitir atuar na sua prevenção e diminuição do agravamento da doença.

### 1.1.1. Formação das espécies reativas de oxigénio

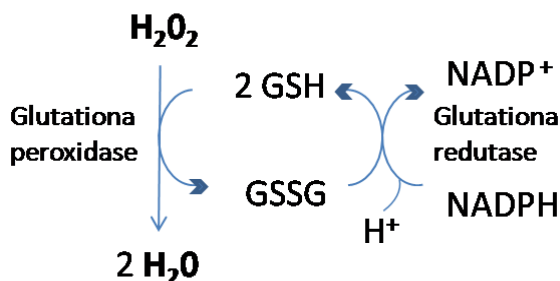
As espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês "reactive oxygen species") são compostos (átomos, moléculas ou iões), parcialmente reduzidos. As ROS são formadas, através de vários processos como radiação, como resultado de uma reação com substâncias ambientais tóxicas, como bioprodutos no metabolismo normal ou por serem requeridas para funções metabólicas e fisiológicas em células especializadas [1]. Estas são biossintetizadas essencialmente durante a respiração celular [30,31], mas também podem ser formadas por ação de enzimas oxidativas localizadas no retículo endoplasmático (RE), citosol, mitocôndria, peroxissomas e lisossomas. Durante a respiração mitocondrial, pela redução do oxigénio a duas moléculas de água resultam as seguintes ROS: o anião superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (figura 2) [30]. Cerca de 90 % do oxigénio da célula é consumido na cadeia respiratória mitocondrial [32,33], tornando a mitocôndria a principal fonte de ROS [8,33], mas em contrapartida também o principal alvo de ataque por radicais [33]. Desse oxigénio molecular aproximadamente 1-5% é convertido em  $O_2^-$  [1,32,33], o principal ROS produzido na mitocôndria, mesmo em condições fisiológicas normais [32,33]. Os complexos I e III são considerados os principais locais de produção de  $O_2^-$  (figura 2), embora existam outros locais, dentro da mitocôndria, que também podem produzir o anião superóxido [34]. O complexo III tem sido descrito como o principal local de produção de ROS [35], uma vez que estas são libertadas para longe do sistema antioxidante da matriz mitocondrial. Por outro lado, o complexo I como liberta as ROS para as proximidades do sistema enzimático antioxidante da mitocôndria [35], estas são neutralizadas mais facilmente.





**Figura 1-3:** Reação de Fenton [38–40].

Para manter a homeostase redox celular, o organismo possui uma grande variedade de compostos com propriedades antioxidantes, pertencentes a sistemas enzimáticos e não enzimáticos [1,30,42]. O sistema enzimático é composto por enzimas que degradam especificamente algumas ROS. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido a oxigénio e peróxido de hidrogénio [1]. A catalase promove uma reação onde duas moléculas de peróxido de hidrogénio são convertidas em duas moléculas de água e oxigénio molecular (figura 2) [42]. A enzima glutathiona peroxidase (GPx) converte peróxido de hidrogénio em água, numa reação em que a glutathiona reduzida (GSH) é convertida a glutathiona oxidada (GSSG) (figura 4) [1,42]. Uma outra enzima importante é a glutathiona redutase, que reduz a glutathiona dissulfeto (produto da redução do peróxido de hidrogénio) a glutathiona (figura 4) [4]. O tiol regulador redox não enzimático mais importante é a glutathiona (GSH), um substrato da enzima glutathiona peroxidase (figura 4). Também a ceruloplasmina e transferrina são outras enzimas antioxidantes que regulam os níveis de ROS no organismo [30,42].



**Figura 1-4:** Reação catalisada pela glutathiona peroxidase e a glutathiona redutase.

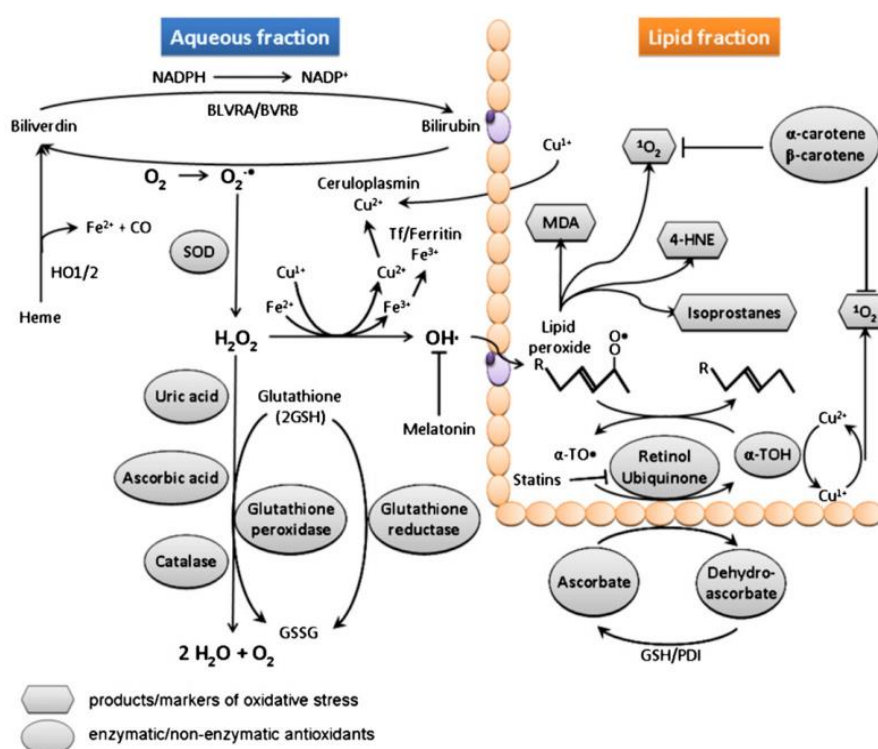
Apesar do sistema enzimático e não enzimático antioxidante do organismo, existem inúmeros fatores que levam ao aumento da concentração de ROS e/ou a uma redução na atividade antioxidante. Esta elevada concentração de ROS pode resultar tanto de fatores endógenos como exógenos [1]. O aumento de ROS no organismo está associado ao dano celular, como à oxidação de biomoléculas importantes [1,3]. Este dano oxidativo pode ocorrer via diferentes mecanismos [43]. Desta forma, as espécies reativas de oxigénio/azoto (RONS) têm um duplo papel: são indispensáveis no metabolismo celular e

de sinalização [36] como, quando em concentrações mais elevadas, podem provocar danos nos componentes celulares (proteínas, ADN e lípidos) [1,3].

### **1.1.2. Oxidação de lípidos**

Os lípidos nos organismos vivos podem sofrer oxidação durante a respiração normal aeróbica ou por resultado de exposição a agentes oxidantes [30]. A oxidação dos lípidos, em sistemas biológicos, pode ocorrer através de reações radicalares em sistemas não enzimáticos (OOH,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , radiação) ou por vias não radicalares envolvendo sistemas enzimáticos (lipoxigenase (LOX), mieloperoxidase (MPO)) [44]. A oxidação de lípidos por radicais é uma reação que leva à formação de uma grande variedade de produtos de oxidação, potencialmente tóxicos [45], que afetam negativamente a integridade dos sistemas biológicos [46]. Esta oxidação produz alterações na composição e nas propriedades físico-químicas da bicamada lipídica das membranas [47], nomeadamente a integridade, fluidez e a permeabilidade. A oxidação dos lípidos pode, por exemplo, resultar numa destabilização das membranas dos lisossomas, levando à libertação do conteúdo lisossomal dentro do citoplasma e à consequente morte da célula [45]. A morte celular pode ser induzida por várias e distintas vias de sinalização, de entre as quais por meio de um específico fosfolípido oxidado, a cardiolipina [48].

O *stress* oxidativo *in vivo*, como visto anteriormente, tem efeitos nefastos a nível celular e está associado a numerosas doenças [46]. Por exemplo nos doentes de Alzheimer (AD) têm sido registados níveis anormais de *stress* oxidativo tanto no cérebro como na corrente sanguínea [4]. Por conseguinte, nestes AD foram observadas proteínas e lípidos oxidados (de mitocôndrias isoladas de linfócitos circulantes) [49]. Para além dos produtos de oxidação de biomoléculas observados nos linfócitos, foram ainda identificados produtos quer na circulação sanguínea quer no tecido cerebral [3]. Alguns destes produtos foram considerados potenciais biomarcadores de doenças. Um exemplo é o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), um produto de peroxidação lipídica (figura 5). O 4-HNE é quantificado no soro nos AD e comparativamente aos controlos tem sido encontrado marcadamente elevado (> 90%) nestes doentes.

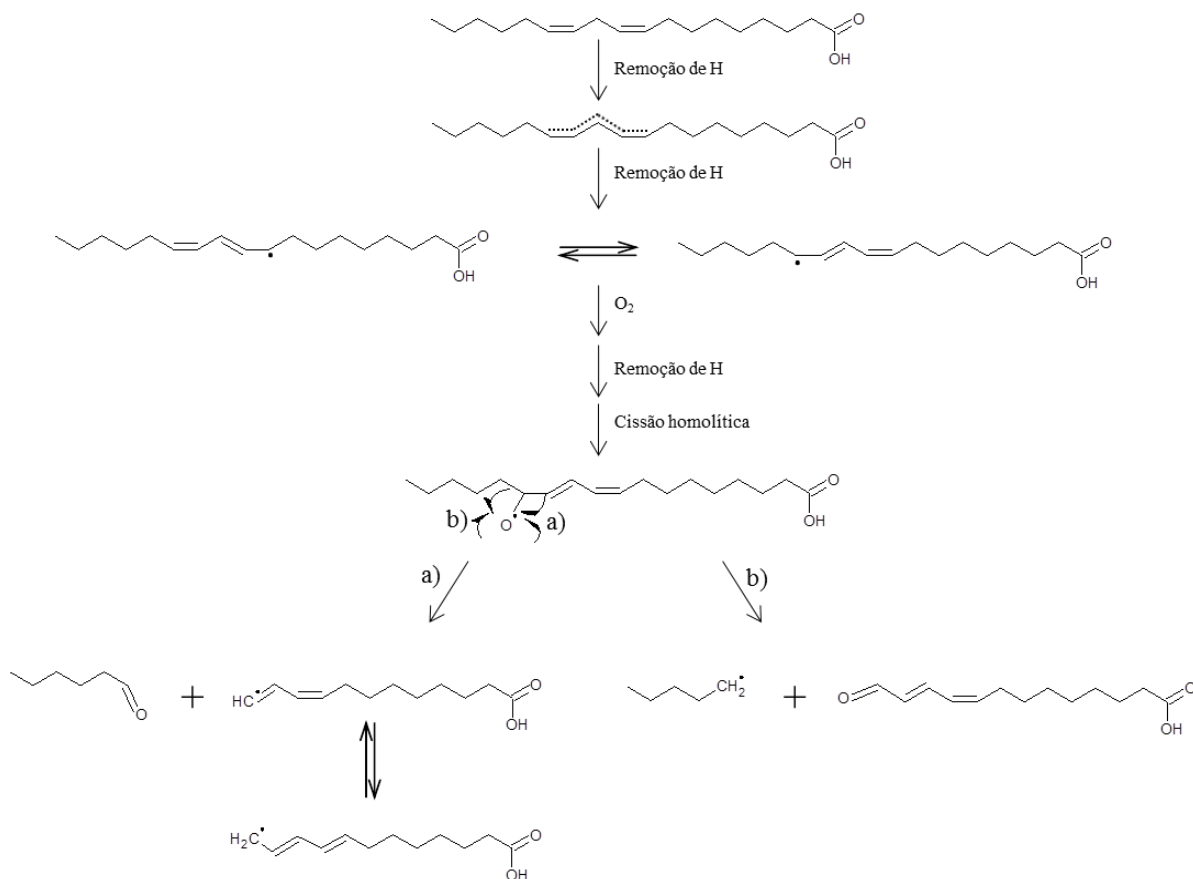


**Figura 1-5:** Vias antioxidantes e vias oxidativas com alguns dos produtos de peroxidação lipídica utilizados como biomarcadores de *stress* oxidativo [4].

Acredita-se que o desenvolvimento das patologias do sistema nervoso central (SNC), como o Alzheimer, está associado à peroxidação lipídica e acumulação dos correspondentes produtos de oxidação [50]. No SNC, o dano oxidativo está intimamente associado à peroxidação lipídica, uma vez que este sistema é rico em ácidos gordos polinsaturados e tem uma relativa escassez do sistema antioxidante [5]. Nas últimas décadas, tem-se colocado a possibilidade dos fosfolípidos oxidados estarem envolvidos no desenvolvimento de muitos processos patofisiológicos, tais como os mencionados em cima [51] e portanto os estudos de oxidação de lípidos têm sido focados principalmente na análise de fosfolípidos. Os fosfolípidos contêm principalmente resíduos de ácidos gordos saturados e monoinsaturados e portanto seriam pobres substratos de oxidação [10]. Todavia tem sido demonstrado que fosfolípidos com estruturas contendo um grupo hidroxilo livre na posição beta da ligação fosfoéster (por exemplo a cardiolipina) sofre, conjuntamente com peroxidação, processos de fragmentação por radicais livres [52]. Além disso, verificou-se que os ácidos gordos mono e polinsaturados dos fosfolípidos podem ser oxidados pelas ROS [53]. A facilidade de oxidação destes ácidos gordos deve-se ao fato dos átomos de hidrogénio imediatamente adjacentes a uma dupla ligação exibirem baixa

energia de ligação C-H. Porém, os hidrogénios localizados nos grupos metileno entre duas duplas ligações apresentam ainda menor energia da ligação C-H. Esta baixa energia permite que os átomos de hidrogénio sejam removidos pelas ROS, levando à formação de fosfolípidos radicalares com o radical centrado no átomo do carbono alílico. Uma vez formado o radical  $L\cdot$ , este reage imediatamente com o oxigénio molecular formando o radical peroxilo ( $LOO\cdot$ ), reação correspondente à fase de iniciação da peroxidação lipídica. A fase de propagação da peroxidação lipídica (fase em que ocorre dano de múltiplos lípidos), corresponde à formação de radicais centrados no carbono ou no oxigénio:  $L\cdot$ ,  $OL\cdot$ ,  $HOL\cdot$ ,  $LO\cdot$ ,  $OLOO\cdot$  (figura 6). Por sua vez estes radicais podem estabilizar por remoção de átomos de hidrogénio das moléculas vizinhas (cadeias de ácidos gordos mono e ou polinsaturados de fosfolípidos), formando mais radicais centrados no carbono e lípidos oxidados. O passo final da peroxidação é a terminação que pode ocorrer por duas maneiras distintas. Por reação radical-radical formando produtos não radicalares ou por antioxidantes que quebram a cadeia lipofílica formando produtos radicalares relativamente estáveis [54]. Estes produtos resultantes das reações de oxidação podem ser classificados de acordo com a natureza da sua modificação [55]:

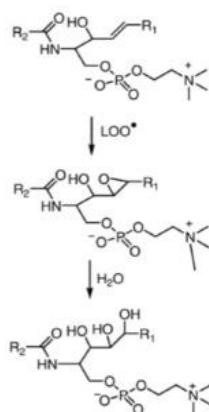
1. Produtos de oxidação de cadeia longa (do inglês “*long-chain*”), que preservam a estrutura molecular do fosfolípido;
2. Produtos de oxidação de cadeia curta (do inglês “*short-chain*”) formados por quebra das cadeias de ácidos gordos insaturados;
3. Aductos, formados pela reação entre produtos de oxidação de lípidos e moléculas contendo grupos nucleofílicos.



**Figura 1-6: Resumo da reação radicalar de peroxidação lipídica:** esta reação inicia-se pela remoção de um hidrogénio pelo radical hidroxilo, um dos ROS mais reactivos, originando o radical alquilo lipídico. Este por sua vez leva à formação do radical alcoxilo  $LO^\bullet$  que pode sofrer cisão e originar produtos radiculares e carbonilos, com produtos distintos via (a) e (b) [54].

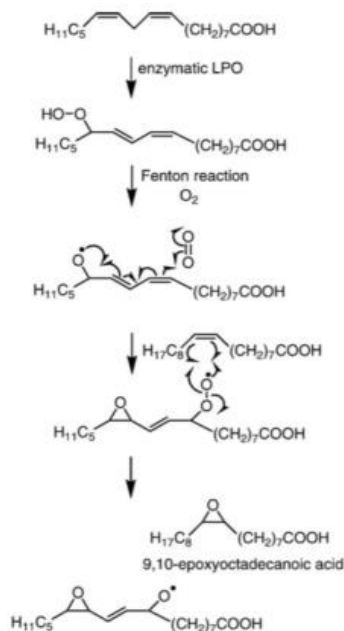
Curiosamente, o conhecimento dos efeitos das reações oxidativas em glicosfingolípido e mesmo de esfingolípido é escasso. Sabe-se que os esfingolípido possuem uma única dupla ligação na cadeia de esfingosina, que pode ser atacada por radicais livres, como o radical peroxilo, formando epóxidos e seus produtos de hidrólise (figura 7). Estes radicais (formados por reações não enzimáticas) atacam todos os tipos de moléculas contendo duplas ligações por epoxidação [53]. Em 2012, uma análise (por MS) de amostras de esfingolípido oxidados, pela reação de Fenton, permitiu a detecção de produtos de oxidação da esfingosilfosfolina (SPC) e esfingomielina (SM), não tendo sido detetados produtos de oxidação para as ceramidas.





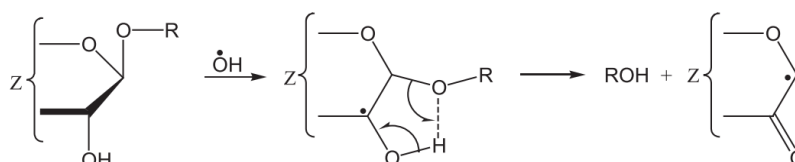
**Figura 1-7:** Epoxidação da ligação dupla de esfingolípido pelo radical peróxido ( $\text{LOO}^\bullet$ ) e hidrólise do respetivo epóxido [53].

A escassez de estudos sobre a oxidação de GSLs pode dever-se ao facto destes compostos serem predominantemente formados por ácidos gordos saturados ou mono insaturados, que não são muito suscetíveis à oxidação [10]. No entanto estudos *in vitro* provaram que PLs com ácido oleico, um ácido gordo monoinsaturado (ácido gordo com 18 carbonos e apenas uma ligação dupla, (18:1)) podem sofrer oxidação. A oxidação deste ácido gordo monoinsaturado leva à formação de produtos de oxidação de cadeia longa (derivados epóxi-), mas não de cadeia curta [55] (figura 8).



**Figura 1-8:** Formação do derivado epóxi do ácido oleico pelo radical  $\text{LOO}^\bullet$  [53]

Além da cadeia de esfingosina e de um ácido gordo os GSLs também são compostos por uma cadeia de hidratos de carbono. A presença de hidratos de carbono também não aparenta ser um ponto de grande suscetibilidade à oxidação. No entanto, foi observado a despolimerização oxidativa de oligossacarídeos, assim como formação de ácido galacturônico resultante do GalMan<sub>2</sub>, como resultado de oxidação de oligossacarídeos expostos a radicais hidroxilo [13]. Apenas três publicações identificaram modificações oxidativas de glicosfingolípidos. Duas publicações estudaram a oxidação da glucosilceramida (GlcCer) [12,15] e uma a galactosilceramida (GalCer) [10]. Ambos os glicosfingolípidos são cerebrosídeos, ou seja contém apenas um resíduo de açúcar. Os produtos de oxidação identificados no caso da oxidação da glucosilceramida, induzida por radiação gama ou na presença de um agente oxidante TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidina), foram as ceramidas [12] e a glucuronilceramida [15] respectivamente. Os produtos de oxidação da galactosilceramida formados por oxidação induzida por radiação gama também foram ceramidas [10]. Recentemente foi realizada uma análise (por MS) a lactosilceramidas e galactosilceramidas oxidadas, após foto oxidação induzida por UVA. Neste estudo observaram-se curiosamente derivados hidroperoxi- para ambos os GSLs. Para a LacCer também observaram um outro produto de oxidação: um derivado hidroperoxi da glucosilceramida. A formação deste derivado foi justificada como resultante da quebra oxidativa da lactose com a perda do resíduo de galactose. Além disso, observaram a presença de isômeros para estes derivados hidroperoxi, com um isômero com o grupo (-OOH) ligado à cadeia de esfingosina e outro na cadeia de ácido gordo insaturado. Adicionalmente, para a LacCer, identificou-se um produto em que o hidroperoxi se encontrava localizado no dissacarídeo [28]. Tanto a lactosilceramida, como a glucosilceramida e a galactosilceramida contêm um grupo hidroxilo na posição beta da ligação glicosídica permitindo a fragmentação do composto por radicais (figuras 9). Esta fragmentação pode acontecer nas células sob *stress* oxidativo [10].



**Figura 1-9:** Fragmentação da glucosilceramida pelos radicais hidroxilo por um mecanismo radicalar com radicais centrados em C2 no resíduo de glucose, com R a corresponder à ceramida e z ao resto do resíduo de glucose [12].

Em suma, todos os glicosfingolípídeos com uma dupla ligação na base esfingóide da ceramida, e que contêm um grupo hidroxilo na posição beta da ligação glicosídica, podem sofrer oxidação e/ou fragmentação radicalar.

## **1.2. Esfingolípídeos como uma classe específica de lípidos**

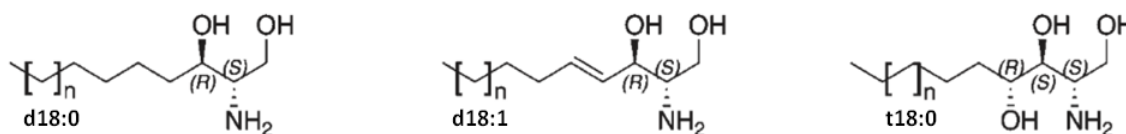
Os lípidos são um grupo diverso quimicamente e uma característica que todos têm em comum é a solubilidade em compostos orgânicos e insolubilidade em água [56,57]. Estes compostos incluem uma enorme variedade estrutural e têm importantes funções biológicas, atuando como componentes estruturais de membranas plasmáticas de mitocôndrias, de vesículas intracelulares e outros organelos relacionados (membranas do complexo de Golgi, endossomas, entre outros), e mesmo do núcleo [56,58,59]. Além disso, também atuam como fontes de armazenamento de energia e participam nas vias de sinalização. Alguns, embora em menor quantidade, exercem um papel como cofatores enzimáticos, transportadores, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormonas, mensageiros intracelulares, moléculas hidrofóbicas na ligação a proteínas e auxiliam no *fold* das proteínas de membrana [56,57].

Os esfingolípídeos (SLs) constituem uma das classes mais diversificada estruturalmente [58] e neste trabalho, como já referido, debruçar-nos-emos predominantemente nesta classe de lípidos, mais especificamente nos glicosfingolípídeos. Os esfingolípídeos são encontrados em todos os eucariotas (animais, plantas e fungos), alguns procariotas e vírus [58,59]. São considerados essencialmente lípidos do cérebro e por isso apresentam nomes como esfingomielinas, cerebrósidos, gangliósidos, entre outros [60]. Estima-se que constituem cerca de 30% de todos os lípidos da membrana plasmática [58], encontram-se distribuídos assimetricamente pela membrana e concentram-se em microdomínios como os *rafts* lipídicos [58,60]. Nestes microdomínios os SLs podem influenciar a localização e função dos transportadores e receptores de membrana [60].

### **1.2.1. Diversidade estrutural e nomenclatura dos esfingolípídeos**

Os esfingolípídeos têm um grupo cabeça polar e duas caudas não polares. Não contém glicerol como os glicerofosfolípídeos, mas sim uma cadeia principal base esfingóide [56,60]. As bases esfingóides mais comuns nos mamíferos são: esfingosina (2-amino-1,3-

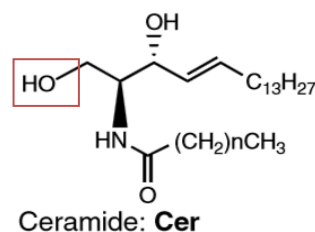
dihidroxi-octadeceno, So) e esfinganina (2-amino-1,3-dihidroxi-octadecano, Sa). Nas leveduras e plantas as mais comuns são a fitoesfingosina (2-amino-1,3,4-trihidroxi-octadecano), a esfinganina e seus homólogos eicosa (20 fitoesfingosina e 20 esfinganina) [58]. As bases esfingóides variam em diversas características nomeadamente: no comprimento da cadeia alquilo, na posição e no número de duplas ligações, no número de grupos hidroxilo [58,61] e na ramificação de grupos metilo [58]. As bases esfingóides podem conter uma dupla ligação na posição 4 ou 8 ou ter duplas ligações nas posições 4 e 8 (por exemplo nas plantas) [58]. Uma nomenclatura possível para as bases esfingóides é indicar o número de grupos hidroxilo d, para dois hidroxilos de esfingosina e esfinganina; e t, para três hidroxilos de fitoesfingosina. De seguida é indicado o comprimento da cadeia (tipicamente 18 carbonos) e o número de duplas ligações (maioria das vezes 0, 1 ou algumas vezes 2). Portanto as designações “d18:0”, “d18:1” e “t18:0” da esfinganina, esfingosina e fitoesfingosina, respetivamente (figura 10) [60] indicam a estrutura da cadeia carbonada.



**Figura 1-10:** As bases esfingóides: esfinganina “d18:0”, esfingosina “d18:1” e fitoesfingosina “t18:0” [61].

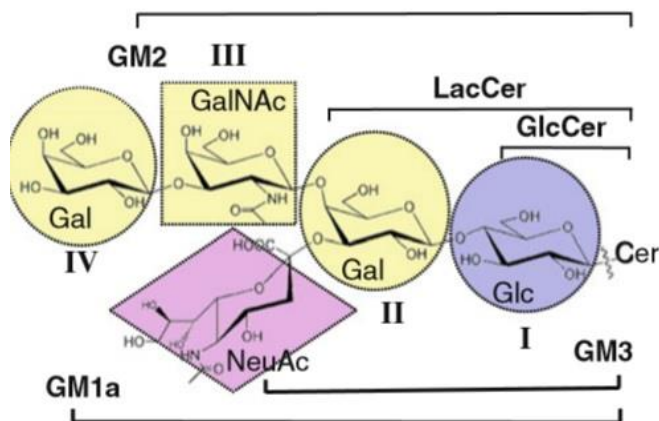
As variações estruturais mais comuns das bases esfingóides de mamíferos são: cadeias longas eicosa esfingosina (d20:1) encontradas nos gangliósidos do cérebro, e presença de duas duplas ligações (d18:2) em alguns dos esfingolípidos encontrados no plasma e cérebro [61]. Os esfingolípidos podem ainda ter grupos hidroxilo em diversas posições [61]. Além da base esfingóide, também faz parte integrante da composição dos esfingolípidos um ácido gordo, que está ligado por uma ligação amida [56,60]. Estas bases esfingóides derivadas de N-acilo têm o nome de ceramidas (figura 11) [58]. Estes ácidos gordos também variam no comprimento da cadeia, no grau de insaturação [11] e na presença ou ausência de um grupo hidroxilo no átomo de carbono  $\alpha$  ou  $\omega$  [60]. Os ácidos gordos ligados às ceramidas têm geralmente 14 a 36 átomos de carbono e são na maioria saturados mas em alguns casos podem ser altamente insaturados [11]. Uma nomenclatura possível é dar o nome do ácido gordo seguido pela base esfingóide, por exemplo N-palmitoil esfingosina (“d18:1/16:0”) [60]. Existe uma enorme variedade de ceramidas

devido às inúmeras combinações de diferentes bases esfingóides com diferentes ácidos gordos (incluindo seus análogos hidroxí) [58].



**Figura 1-11:** Estrutura molecular da ceramida em que o grupo hidroxilo primário está sinalizado a vermelho [58].

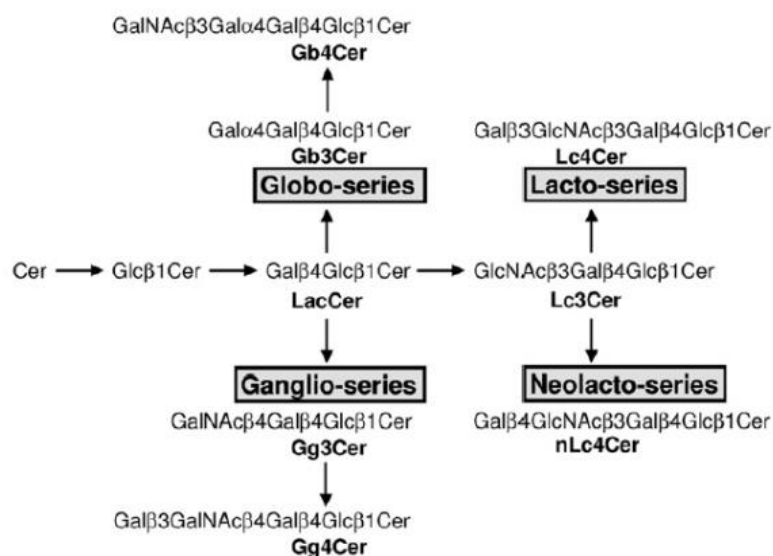
O grupo hidroxilo primário (ligado ao C1) da ceramida pode ainda estar ligado a um grupo de cabeça polar por uma ligação glicosídica (se for um açúcar) ou por uma ligação fosfodiéster [56,60]. A variação do grupo ligado ao grupo hidroxilo primário (o grupo cabeça polar), ao grupo N-acil e à base esfingóide resulta numa melhor distinção química dos inúmeros esfingolípídeos [58]. Os esfingolípídeos são assim agrupados em três subclasses: esfingomielinas, glicosfingolípídeos e gangliósidos (glicosfingolípídeos acídicos), todos derivados de ceramida diferindo nos seus grupos cabeça [56]. De entre os esfingolípídeos destacamos os cuja cabeça está ligada a um grupo fosfato, denominados fosfo-esfingolípídeos. Estes fosfo-esfingolípídeos contêm as respetivas bases esfingóides: base esfingóide 1-fosfato, Cer 1-fosfato e esfingomielina. Estas bases correspondem aos fosfo-esfingolípídeos mais prevalentes na maioria das células dos mamíferos [60]. As esfingomielinas contêm fosfocolina ou fosfoetanolamina como grupo cabeça polar [56]. Os glicosfingolípídeos têm grupos cabeça polar com um ou mais açúcares ligados ao grupo hidroxilo primário da ceramida. Nos glicosfingolípídeos podemos distinguir ainda os cerebrósidos e os globósidos. Cerebrósidos têm apenas um açúcar ligado (geralmente a Glc), enquanto que os globósidos têm dois ou mais açúcares ligados (geralmente várias moléculas de Glc e Gal) (figura 12) [56]. Os cerebrósidos também são precursores dos glicosfingolípídeos mais complexos, sendo o mais simples a lactosilceramida (LacCer com apenas dois resíduos) (figura 12) [58].



**Figura 1-12: Exemplos de grupos cabeça de glicosfingolípídeos** [60]. A glucosilceramida (GlcCer) é composta por uma ceramida (Cer) ligada a um resíduo de glucose (Glc); a lactosilceramida (LacCer) é constituída pela Cer e dois hidratos de carbono, com o resíduo de Glc (I) ligado ao grupo hidroxilo da Cer e o resíduo de Galactose (II) (Gal) ligada ao resíduo de Glc (I); o Monogangliósido 3 (GM3) tem uma Cer ligada a um resíduo de Glc (I), que por sua vez está ligado ao resíduo de Gal (II) e este a um resíduo de ácido N-acetil neuramínico (NeuAc); o Monogangliósido 2 (GM2) é composto pelo mesmo grupo cabeça que o GM3 mas com um resíduo a mais de N-Acetil galactosamina (III) (GalNAc) ligado também ao resíduo de Gal (II) como o resíduo de NeuAc; o Monogangliósido (GM1a) composto pelo mesmo grupo cabeça que o GM2 mas com um resíduo a mais de Gal (IV) ligado ao resíduo de GalNAc (III).

Os glicosfingolípidos subdividem-se em quatro principais famílias estruturais: a gânglio (Gg)-, globo (Gb)-, Lacto (Lc)- ou neolacto (nLc)-séries [11]. O nome de certos glicosfingolípidos têm a designação da família estrutural, o número de unidades monossacarídicas e a ceramida abreviada por “Cer”, (exemplo: lactotetraosilceramida representada como Lc4Cer) (figura 13) [62]. Por fim temos os glicosfingolípidos acídicos com ácido siálico na sua estrutura, denominados gangliósidos por Ernst Klenk em 1942 [63]. Os gangliósidos têm como seus grupos cabeça polar cadeias de hidratos de carbono com um ou mais resíduos de ácido N-acetilneuramínico, um tipo de ácido siálico. Este grupo é responsável pela carga negativa dos gangliósidos a pH 7, o que os distingue dos globósidos constituídos só por açúcares neutros (glucose e galactose) [56]. Os gangliósidos são designados pelo nome da família do glicosfingolípido a que o ácido siálico é ligado e o número de monossacarídeos, como referido anteriormente (figura 13). Além disso um número romano indica o resíduo de monossacarídeo a que o ácido siálico está ligado (contado a partir do monossacarídeo mais próximo da ceramida). Também um número arábico é requerido, para indicar a posição exata do carbono com o respetivo grupo hidroxilo no resíduo de açúcar à qual o ácido siálico está ligado (exemplo: II<sup>3</sup>Neu5Ac-

Gg4Cer). Todas as hexoses estão na forma de piranose em configuração D e as ligações glicosídicas formadas a partir do grupo hidroxilo no carbono 1 (C-1). A ligação do Neu5Ac com a galactose (Gal) é quase sempre através do grupo hidroxilo no carbono 2 (C-2) em configuração  $\alpha$ 3- ou  $\alpha$ 6- [11]. Assim, considerando a enorme diversidade estrutural dos glicosfingolípídeos deduz-se que as suas análises estruturais devem ser efetuadas cuidadosamente. Esta diversidade estrutural é importante para as funções biológicas dos GSLs. Cada espécie resultante de GSL tem um papel biológico específico e estes são reconhecidos nos tecidos e células em proporções fixas. Pelo que estas proporções são mantidas por uma regulação mediada por uma rede de vias metabólicas, denominada a biossíntese dos esfingolípídeos.



**Figura 1-13:** O esquema de biossíntese dos glicosfingolípídeos e suas estruturas [11].

### 1.2.2. Biossíntese dos esfingolípídeos

O metabolismo dos esfingolípídeos é muito importante para um correto funcionamento do organismo. Uma alteração no metabolismo dos esfingolípídeos resulta no desenvolvimento de várias doenças [9]. A biossíntese da maioria dos esfingolípídeos complexos começa com a formação da Cer [27,60,64] e todas as enzimas envolvidas na sua formação estão localizadas no folheto citosólico da membrana do RE. A formação da ceramida é iniciada pela serina palmitoil transferase (SPT) que catalisa a condensação da L-serina com um acil gordo CoA resultando em 3-cetoesfinganinas (figura 14). Para a atividade desta enzima, nos mamíferos e leveduras, é requerida a transcrição dos genes pelo menos do SPTLC1 e do SPTLC2. Em 2006 demonstraram que o produto do gene

SPTLC3 também parece estar envolvido na atividade da enzima SPT [65]. Em 2009 observaram que o aminoácido L-alanina também é um substrato da SPT e que as respectivas reações resultam numa nova base esfingóide, a 1-deoxiesfinganina (1-deoxiSa) [66]. O aminoácido D-serina por sua vez é um inibidor competitivo da enzima. Como referido anteriormente, para além do aminoácido principal a enzima palmitoil transferase requer um co-substrato, um acil gordo CoA, onde é igualmente seletiva. O co-substrato preferencial é o palmitoil-CoA (C16:0), ao qual se segue o pentadecanoil- e heptadecanoil-CoA (C15:0 e C17:0) e, por último, o estearoil-CoA (C18:0) e acil gordos essencialmente saturados e o ácido palmitelaídico (16:1 com uma dupla ligação trans). Nos casos em que a SPT é composta por SPTLC3, é mais seletiva para o miristoil-CoA formando a família de bases esfingóides d16:0 [60]. A segunda enzima imprescindível à formação da ceramida é a 3-cetoesfinganina redutase que catalisa a reação de redução, dependente de NADPH, da 3-cetoesfinganina a D-eritro-esfinganina (figura 14). Posteriormente uma N-aciltransferase acetila a esfinganina convertendo assim em (dihidro)ceramida. A maior parte das (dihidro)ceramidas formadas são então insaturadas a ceramidas pela (dihidro)ceramida desaturase (DES1 e DES2). Esta enzima é responsável pela inserção de uma 4,5-dupla ligação trans na base esfingóide (figura 14).

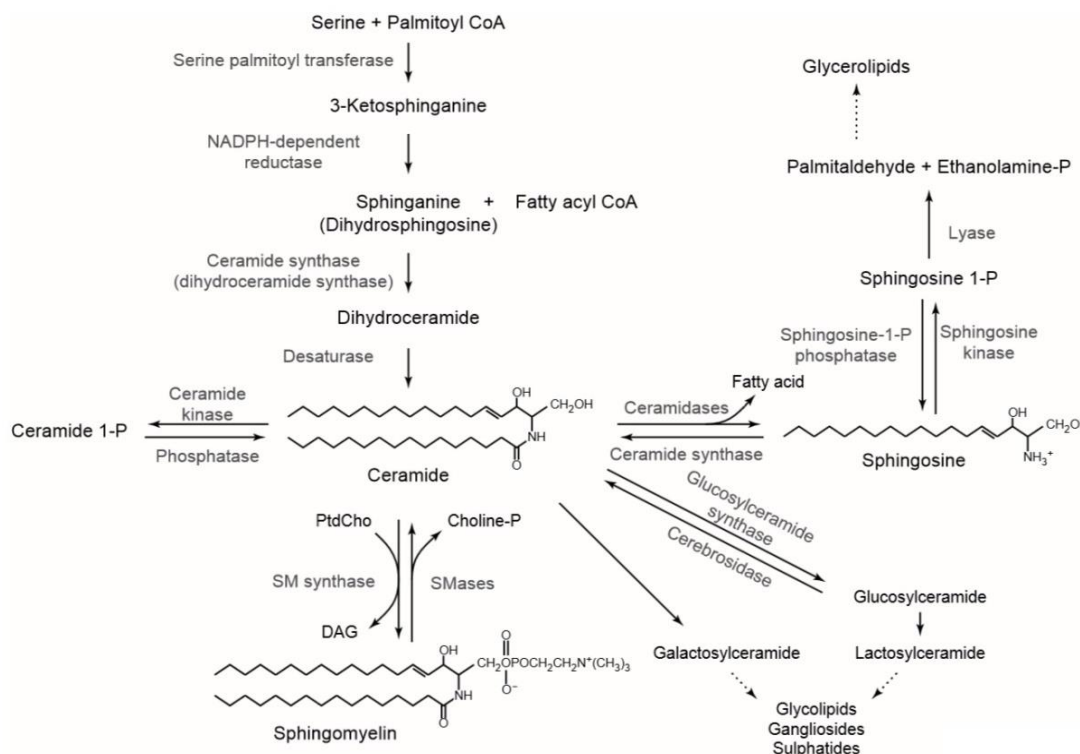
A base esfingóide denominada de esfingosina é formada durante a degradação dos esfingolípidos. Para a síntese de esfingosina, a ceramidase (presente em lisossomas e outras membranas) hidrolisa a ceramida em base esfingóide e ácidos gordos. Esta base esfingóide pode ainda sofrer fosforilação resultando na formação de esfingosina 1-fosfato (figura 14) como revisto em [27]. A biossíntese de esfingolípidos complexos ocorre por adição de vários grupos cabeça à ceramida via enzimas específicas:

- A ceramida cinase (CerK) adiciona fosfato (vindo do ATP) à ceramida, formando a Cer-1P (figura 14);
- A esfingomielina sintase (SMS) adiciona fosfatidilcolina à ceramida resultando na esfingomielina, com suas isoformas SMS1 (localizado no complexo de Golgi) e SMS2 (localizado na membrana plasmática).
- A enzima semelhante-SMS1 (do inglês: "SMS1-related enzyme") adiciona fosfoetanolamina à ceramida formando a ceramida fosfoetanolamina (CFE) no lúmen do retículo endoplasmático. Esta tem demonstrado funcionar como um regulador da homeostase da Cer produzindo apenas vestígios de CFE.



- A Cer glucosiltransferase (CGlcT) e a Cer galactosiltransferase (CGalT) formam GlcCer e GalCer, respetivamente, pela adição da correspondente hexose vinda da uridina difosfato: UDP-Glc ou UDP-Gal.

A GalCer é sintetizada no lúmen do retículo endoplasmático, ao passo que a GlcCer acredita-se ser sintetizada no revestimento da membrana citosólica. A GalCer ainda serve de substrato à enzima sulfatotransferase. Esta enzima transfere o sulfato do 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato para a GalCer resultando na formação de sulfatídeos (3'-sulfo-galactosilceramida) [60]. Os glicosfingolípidos com cadeias glicosiladas maiores, pelo menos a maioria deles, são sintetizados pela adição gradual de moléculas de hidratos de carbono à GlcCer por ação de glicosiltransferases (GTs) [27,60]. Por exemplo a LacCer, o precursor comum para as séries de glicosfingolípidos, é formada pela adição de uma galactose vinda de UDP-Gal à GlcCer, catalisada pela galactosiltransferase I. Tanto a formação da LacCer como as reações que levam a lípidos altamente glicosilados ocorre no folheto luminal da membrana de Golgi. Portanto, para a síntese destes lípidos, é necessário que a GlcCer seja transportada através da membrana de Golgi. A biossíntese dos gangliósidos também é realizada por glicosiltransferases no lúmen do complexo de Golgi. O seu precursor comum também corresponde à lactosilceramida exceto o GM4 [27]. Os glicosfingolípidos quando "maduros" são transferidos via transporte vesicular para a superfície celular onde se tornam componentes de membrana celular [60].



**Figura 1-14:** Imagem representativa da biossíntese de esfingolípidos [67].

### 1.3. Localização e função dos glicosfingolípidos

#### 1.3.1. Esfingolípidos como constituintes de membranas plasmáticas

Os glicosfingolípidos estão presentes nas membranas plasmáticas embora em maior concentração em domínios membranares específicos, como por exemplo em rafts lipídicos [11]. Os oligodendrócitos e a mielina são ricos em glicosfingolípidos, particularmente os galactocerebrósidos e seus derivados sulfatados, sulfogalactosilceramidas [68]. Nas membranas de mielina os galactocerebrósidos correspondem a aproximadamente 20 % de todos os lípidos e estão presentes no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP). Estes glicosfingolípidos, presentes nas membranas de mielina, estão localizados exclusivamente no folheto externo [68]. Acredita-se ainda que uma concentração elevada de GalCer é mantida na membrana, a fim de transmitir à mielina propriedades necessárias a uma correta transmissão do pulso nervoso. A GalCer, além de participar na adesão entre as superfícies externas da mielina ainda fornece estabilidade e garante as funções dinâmicas das membranas da mesma. Assim acredita-se que uma inibição do metabolismo de GalCer nas células nervosas pode levar a várias doenças desmielinizantes [10].

Os gangliósidos estão localizados principalmente na monocamada externa das membranas, com a respetiva cadeia oligossacarídica na superfície extracelular e a porção ceramida inserida na membrana. A porção ceramida está em contacto com os vários componentes da membrana, particularmente lípidos e proteínas [18,69]. Os gangliósidos são expressos nas membranas de todos os tecidos dos vertebrados, principalmente no tecido nervoso. Estão localizados especificamente nos sinaptossomas, onde representam cerca de 10 a 15 % do conteúdo total de lípidos [69]. Os gangliósidos predominantes no cérebro dos mamíferos são o GM1, o GD1a, GD1b e o GT1b, correspondendo a 80-90 % do conteúdo total de gangliósidos [70]. Contudo, só o gangliósido exógeno GM1 corresponde a aproximadamente 30 % do conteúdo total de gangliósidos [69]. Os gangliósidos também podem estar localizados em domínios da membrana celular. Estes são denominados de microdomínios enriquecidos de glicosfingolípídeos (MEG) [17,18].

Os gangliósidos têm variadas funções nas células, desde determinação da organização estrutural e funcional da membrana plasmática das células, tomando parte na regulação da diferenciação, plasticidade e regeneração das células nervosas. Estes têm também um papel crucial nos processos de interação intracelular e receção de substâncias biologicamente ativas [69]. Foi ainda sugerida a participação dos gangliósidos nos processos de crescimento, reconhecimento [17,18] e na capacidade de modular os sistemas de transdução de sinal [17,18,71]. As altas concentrações no tecido nervoso sugerem que estes compostos têm um propósito específico neste tecido [72]. O aumento significativo dos principais gangliósidos durante algumas fases da diferenciação neuronal, como nos processos de neuritogénese e sinaptogénese, sugere uma necessidade funcional dos gangliósidos nestes processos [73]. Similarmente, durante o desenvolvimento cerebral foram registadas variações de concentração de certos tipos de gangliósidos. Assim, acredita-se que o crescimento e a maturação do SNC seja particularmente influenciado por estes lípidos [72,73].

Se os gangliósidos exercem uma determinada função, a sua localização fica limitada aos respetivos locais onde atuam ou, pelo menos, poderá ser importante para a sua função estarem em maior concentração nesse local em particular [70]. Já em 1980 foram registadas altas concentrações de gangliósidos nas terminações sinápticas [72]. Posteriormente verificou-se que os gangliósidos são componentes característicos das membranas sinaptossomais e acredita-se estarem presentes em ambas as membranas pré-

sinápticas e pós-sinápticas [74]. Assim acredita-se na participação destes em alguns eventos da transmissão sináptica [72,74].

Os gangliósidos exógenos têm a habilidade de ser incorporados na membrana plasmática neuronal, atuando como gangliósidos endógenos [75]. Curiosamente, a utilização clínica de gangliósidos tem sido proposta para uma variedade de patologias relacionadas com lesões no SNC [71], nomeadamente na doença de Parkinson [76]. Um dos gangliósidos mais estudado para a utilização clínica é o GM1, embora somente 1 a 3 % da dose de GM1 administrado parenteralmente ultrapasse a barreira hematoencefálica [77]. No entanto, pelo menos, um estudo demonstrou os efeitos protetores do GM1 no parkinsonismo induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina:

- Restabeleceu o conteúdo parcial da dopamina [76].
- Aumentou a síntese de dopamina nos neurónios residuais [76].

Um outro possível mecanismo de neuroprotecção para o gangliósido GM1 está relacionado com a sua ação antioxidante, tanto *in vivo* como *in vitro* [78]. Esta ação antioxidante está intimamente relacionada com a capacidade dos gangliósidos, em geral, inibirem a fosfolipase A2 e a óxido nítrico sintase. Estas enzimas são responsáveis pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigénio e azoto, respetivamente. Desta forma, a inibição dessas enzimas pode levar à diminuição de radicais livres nas células nervosas. Assim, a administração de gangliósidos pode ter um efeito na viabilidade das células nervosas precisamente por diminuir o *stress* oxidativo e consequentemente prevenir a morte celular [71].

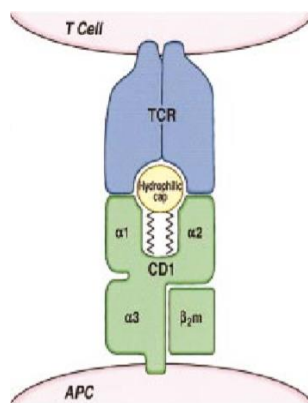
### **1.3.2. Função dos glicosfingolípídeos como moléculas imunoregulatórias**

Como visto anteriormente, a biossíntese dos glicosfingolípídeos rigorosamente controlada por vias enzimáticas resulta em inúmeras moléculas de natureza distinta. Estas moléculas, como moléculas sinalizadoras, contêm informação que pode ser útil para o sistema imunitário na deteção de células modificadas, sob *stress* ou mesmo infectadas [21]. O sistema imunitário é o sistema responsável por sinalizar e, geralmente eliminar as células apoptóticas e as células modificadas (como as células cancerígenas) no organismo. O sistema imunitário é também responsável pela defesa do organismo à invasão microbial [30]. As células que respondem à invasão microbial são os glóbulos brancos, e nesta resposta os mais importantes são os leucócitos polimorfonucleares (mais especificamente

os neutrófilos) [79]. Os neutrófilos migram para os locais de infecção ou lesão tecidual e são mantidos nesses locais pela acumulação local de fatores quimiotáticos de origem exógena ou endógena, sendo um exemplo de fatores endógenos as quimiocinas [80]. O sistema imunitário é composto por um sistema adquirido e um sistema inato [30]. Os componentes do sistema imunitário que participam na imunidade inata são: barreiras epiteliais (bloqueiam a entrada de patógenos), células fagocíticas (principalmente neutrófilos e macrófagos), sistema do complemento (várias proteínas plasmáticas), células dendríticas e as células *natural killer T* (NKT) (um grupo de células T) [30,81].

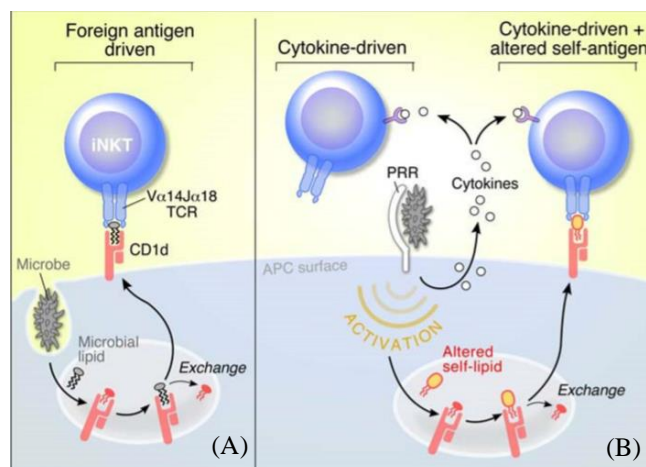
As células NKT possuem recetores de células T (TCR) [81] e recetores de células *natural killer* (NKR) específicos para antígenos [24]. O recetor TCR é caracteristicamente auto-reativo para o recetor CD1 que encontra-se ligado a células apresentadoras de antígenos (APCs) (figura 16) [24]. Nos seres humanos são conhecidos quatro isoformas de recetores, CD1, de CD1a a CD1d [19]. Cada isoforma das proteínas CD1 reconhece e pode ligar-se a lípidos distintos. Assim, dependendo da estrutura do lípido, este é reconhecido por recetores específicos CD1 [24]. O recetor CD1b reconhece lípidos, glicolípidos de bactérias [19] e glicosfingolípidos *self*: os glicosfingolípidos produzidos pelo próprio organismo (exemplo: o GM1[25]). O CD1a e o CD1c também reconhecem os glicosfingolípidos *self*. Por sua vez, os recetores CD1d reconhecem e ligam-se à  $\alpha$ -galactosilceramida. Este glicosfingolípido não está presente nas células dos mamíferos e é conhecido por estimular as células NKT [19,22]. As células NKT também reconhecem um  $\beta$  glicosfingolípido lisossomal, o isoglobotrihexosilceramida (iGb3) [23,24]. Este iGb3 foi proposto como um ligando estimulatório das células NKT no timo [23]. *In vitro*, o iGb3 é visto como um possível esfingolípido estimulatório das células NKT invariantes (iNKT), um subgrupo de células T restritas a CD1d [22]. O sulfatido (3'-sulfo-galactosilceramida) é um GSL presente na mielina e pode ser reconhecido por todas as quatro isoformas CD1 quando presentes a antígeno, estas isoformas são posteriormente reconhecidas pelas células T [22]. Os glicosfingolípidos derivados dos  $\beta$  monohexosilceramidas também foram propostos como candidatos a ligandos de células NKT. Um exemplo é a glucosilceramida [23], como visto anteriormente é um cerebrósido precursor da maioria dos glicosfingolípidos com cadeias glicosiladas maiores [27,60]. Verificou-se que numa linhagem celular onde a expressão da  $\beta$  glucosilceramida sintase estivesse suprimida a estimulação das células NKT era significativamente afetada. Também foi observado *in*

*vivo* que defeitos no tráfico de GSLs para os lisossomas poderiam ser prejudiciais para o desenvolvimento das células NKT [23]. Estes resultados evidenciam a necessidade da glucosilceramida para a atividade e desenvolvimento das células NKT [23].



**Figura 1-15:** Complexo CD1-glicolípido em células apresentadoras de antígenos (APCs) ligado ao recetor das células T (TCR), imagem adaptada do artigo [21].

Os glicosfingolípidos *self* ligam-se a CD1 na superfície celular a pH fisiológico e na ausência de outras proteínas. Deste modo, formam os complexos CD1-glicolípido e assim conseguem estimular as células T auto-reativas (figura 15). Acredita-se que em caso de infecção microbial, os lípidos *self* podem servir como fracos antígenos e ou como ligandos temporários para os recetores CD1. Foi observado que estes lípidos *self* podem ser importantes no *folding* e estabilização da montagem de moléculas CD1. Aquando da infecção microbial estes lípidos *self* são substituídos por antígenos lipídicos microbiais (figura 16 - A) ou outros antígenos lipídicos *self* (figura 16 - B). Além disso, em caso de infecção microbial tem sido observada alteração no conjunto de lípidos *self* nas células apresentadoras de antígenos, com um conjunto de lípidos *self* maioritariamente estimulatórios das células iNKT (figura 16 - B) [22].



**Figura 1-16: Mecanismo de estimulação das células iNKT sobre infecção microbial.** (A) -Ativação das células iNKT através do seu recetor TCR que reconhece os lípidos de micróbios ligados aos recetores CD1d. (B) -Ativação das células iNKT por citocinas inflamatórias ou pelas citocinas em conjunto com a alteração de lípidos *self* produzidos por APCs, aquando da ligação de APCs com os recetores de reconhecimento de padrões (PRRs). Estes lípidos *self* produzidos pelas APCs são também reconhecidos pelos recetores CD1d [22].

A capacidade dos glicosfingolípidos *self* estimular as células T varia consoante o comprimento do ácido gordo (exemplo: GM1 tem maior capacidade estimulatória com o ácido esteárico (18:0)) [19]. Um requerimento adicional de uma estrutura adequada da cadeia lipídica é sugerida pela diferença encontrada entre o GM1 contendo esfinganina (sem duplas ligações) em vez de esfingosina (com uma dupla ligação). A dupla ligação presente na base de esfingosina pode conferir uma conformação mais favorável para a ceramida facilitando, provavelmente, a âncora para CD1 [19].

Foi observado que os gangliósidos humanos também podem inibir marcadamente a resposta da célula T [20]. Neste contexto, verificou-se que também a estrutura da cadeia de hidratos de carbono dos gangliósidos têm influência sobre a atividade imunoregulatória [20]. Inicialmente acreditava-se que um elevado número de ácidos siálicos nos gangliósidos individuais era determinante para uma elevada atividade imunossupressora. Mas em 1992 Ladisch e seus colaboradores verificaram que essa comparação não era totalmente verídica, até porque o GM4 (que tem apenas um ácido siálico) tem alta atividade imunossupressora [20]. Com base na estrutura dos gangliósidos muitos outros aspetos interatuam influenciando esta atividade [20]:

1. A posição do ácido siálico. Por exemplo, se o gangliósido contém um ácido siálico no terminal não redutor do oligossacarídeo (um ácido siálico terminal) ou o(s) ácido(s) siálico(s) ligado(s) no meio dos monossacarídeos (não terminal).
2. A ausência do grupo carboxilo do ácido siálico, por formação de lactonas, diminui a atividade imunossupressora. Isto é, os gangliósidos livres são mais imunossupressores do que as suas formas lactona.
3. O tamanho do oligossacarídeo, pois quanto mais compacta for a molécula, maior é a sua atividade imunossupressora.

Nos doentes oncológicos é frequente o sistema imunitário estar inibido, nomeadamente por diminuição da atividade das células T [20]. Assim, o sistema imunitário inibido não elimina eficazmente as células cancerígenas, permitindo que estas proliferem [20]. Estas células proliferam a uma velocidade superior às células normais [30]. Curiosamente, nestes doentes, a composição dos gangliósidos que são libertados pelas células cancerígenas incluem uma simplificação no número de unidades monossacarídicas, de acordo com o princípio que as estruturas mais simples estão entre as estruturas mais imunossupressoras. Assim, alguns tumores têm elevadas concentrações de gangliósidos potencialmente imunossupressores (exemplo GM3), que estão presentes apenas em baixas concentrações nos tecidos normais. Todas estas evidências demonstram o potencial dos gangliósidos como moléculas imunoregulatórias fisiologicamente importantes [20]. Os glicosfingolípídeos como constituintes de *rafts* lipídicos também têm demonstrado ter um papel importante no sistema imunitário dos mamíferos, atuando como plataformas sinalizadoras. Além disso, os GSLs localizados nestes domínios também estão envolvidos na ativação dos linfócitos T e facilitam a ativação de outras células que participam na imunidade inata [79].

### **1.4. Espectrometria de massa na caracterização estrutural de glicosfingolípídeos nativos e sob oxidação**

As funções exercidas pelos esfingolípídeos no organismo dependem diretamente da sua correspondente estrutura, como referido anteriormente. Deste modo, as possíveis alterações nas estruturas dos esfingolípídeos sujeitos a oxidação radicalar necessitam de ser monitorizadas, uma vez que estas alterações estruturais podem estar a acontecer *in vivo*,



nas células sob *stress* oxidativo, e uma vez que estes lípidos são fundamentais para um correto desempenho do organismo. A técnica mais vastamente utilizada e das mais úteis na análise estrutural de biomoléculas, dentro das quais os lípidos, é a espectrometria de massa (MS) [59,60].

MS é usada para detetar, identificar e caracterizar os lípidos como moléculas carregadas [82]. Na MS o espectrómetro de massa é composto por uma fonte de ionização, um analisador e um detetor [83] e consoante a amostra a ser analisada é indispensável uma seleção prévia da fonte de ionização mais adequada [82]. As fontes de ionização mais usadas na análise de macromoléculas intactas, como os esfingolípidos, são fontes de ionização *soft* em que existe pouca ou quase nenhuma fragmentação, nomeadamente ESI e MALDI. Neste sentido, a utilização de MS/MS (e por vezes  $MS^n$ ) torna-se fundamental para completar a caracterização estrutural das moléculas em estudo. Visto que, MS/MS fragmenta o ião molecular precursor selecionado, via CID, em vários iões produto (observados nos espectros com seus correspondentes valores de  $m/z$ ). Os iões produto característicos dos esfingolípidos complexos são: os seus grupos cabeça e a base esfingóide ou iões produto resultantes da perda neutra dos grupos cabeça [60]. Deste modo, é visível que MS e MS/MS irá permitir propor a localização das modificações oxidativas e que modificações oxidativas ocorrem na estrutura de esfingolípidos complexos sujeitos a oxidação. De facto, a espectrometria de massa (MS) e a espectrometria de massa *tandem* (MS/MS) têm sido amplamente utilizadas na identificação e caracterização das modificações oxidativas da estrutura de fosfolípidos [55,84–86], de ácidos gordos polinsaturados [2,8], de oligossacarídeos [13,87], entre outros. Nos fosfolípidos oxidados, com recurso a estas técnicas, foi possível identificar alterações nas suas cadeias de ácidos gordos, tais como a presença de novos grupos funcionais, como identificar a localização específica destas alterações [55]. Todavia, as modificações oxidativas que ocorrem nos glicosfingolípidos têm sido escassamente estudadas e o estudo das modificações oxidativas de gangliósidos é, até ao momento, inexistente.

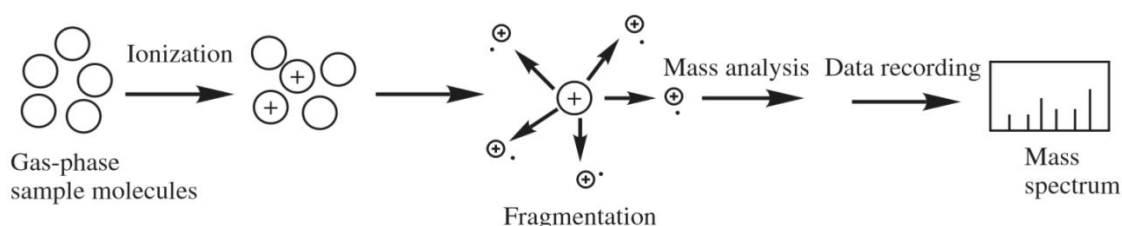
De acordo com estudos prévios [9,10,12,15,28], tal como na caracterização estrutural de esfingolípidos intactos, as fontes de ionização ESI e MALDI em MS e MS/MS também são possíveis de serem utilizadas na caracterização estrutural de esfingolípidos após oxidação. Contudo e apesar das inúmeras vantagens da utilização destas técnicas (MS e MS/MS) na caracterização estrutural de biomoléculas, estas

continuam a ter algumas limitações, para as reduzir tem-se vastamente acoplado MS e MS/MS com técnicas cromatográficas.

### 1.4.1. Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa (MS) ocorre em três passos essenciais (figura 17):

1. Primeiro ocorre a conversão do analito molecular em espécies iónicas na fase gasosa, espécies correspondentes ao ião molecular e seus fragmentos carregados, (estes fragmentos podem surgir das colisões e da transferência de energia durante a ionização).
2. Segue-se a separação e análise da massa das espécies iónicas com base na razão  $m/z$ .
3. Posteriormente a corrente iónica é quantificada, amplificada e disposta na forma de espectro.



**Figura 1-17:** Conceitos fundamentais da espectrometria de massa [83].

Deste modo é possível definir os componentes básicos de um espectrómetro de massa:

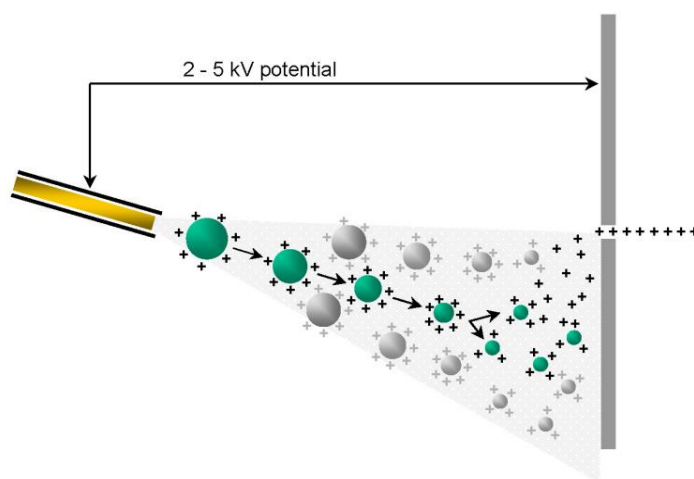
- Um sistema que permite que a amostra seja introduzida na fonte.
- Uma fonte de ionização, que converte moléculas neutras em iões moleculares.
- Um analisador, que separa e analisa a massa dos iões moleculares.
- Um detector, que quantifica e amplifica a corrente iónica dos iões separados por massa [83].

A análise de esfingolípidos nativos como a análise do perfil de esfingolípidos de células, tecidos ou fluídos biológicos (após devida extração) pode ser feita utilizando diferentes fontes de ionização. No nosso estudo vamos identificar e caracterizar esfingolípidos nativos *a priori* e *a posteriori* oxidação. Para esta análise, existem diferentes fontes de ionização possíveis de utilizar, essencialmente: FAB, ESI e MALDI. A ionização

do analito é feita pela remoção ou adição de um próton (íões  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$  respetivamente) e/ou por formação de aductos com catiões metálicos alcalinos (exemplo,  $Na^+$  e  $K^+$ ) e/ou aniões (exemplo  $Cl^-$ ) [83]. A fonte de ionização FAB está em desuso pelo acarreto de certas desvantagens, como o requerimento de quantidades de amostra à escala das microgramas [88], e com o decorrer do tempo pelo aparecimento de novas e aprimoradas fontes de ionização (ESI e MALDI). De facto, estas duas fontes de ionização, como referido anteriormente, são as mais comuns e recentemente utilizadas tanto na análise de esfingolípidos [59,60], fosfolípidos como de fosfolípidos oxidados [55,88].

Em 1995 surgiu o primeiro estudo de caracterização estrutural de gangliósidos nativos por ESI no modo negativo [88]. Nas únicas publicações que identificaram os íões produtos resultantes da oxidação de glicosfingolípidos, por aplicação de radiação gama e TEMPO, os autores utilizaram como fontes de ionização MALDI [10,12] e ESI [15]. Ainda estudos da oxidação, pelo radical hidroxilo, de esfingolípidos [9] e, por foto oxidação induzida por UVA, de galactosilceramidas e lactosilceramidas [28] ambos utilizaram como fonte de ionização ESI. Deste modo e como referido anteriormente, para este estudo, as duas fontes são plausíveis/viáveis, contudo nós apenas recorreremos à fonte de ionização ESI.

#### 1.4.1.1. Fonte de ionização por *electrospray* (ESI)



**Figura 1-18:** Representação da ionização por electrospray [89].

A fonte de *electrospray ionization* via espectrometria de massa revolucionou a análise de macromoléculas, como os esfingolípidos [90]. Esta técnica é caracterizada por ser uma fonte de ionização soft, ou seja, ocorre pouca ou nenhuma fragmentação da molécula no processo de ionização [89] e portanto considerada, por muitos, das fontes de

ionização mais eficazes para análise dos esfingolípídeos. Dependentemente das propriedades químicas do analito a ser analisado, este terá maior propensão a ganhar ou a perder prótons. Os esfingolípídeos acídicos têm maior tendência a perder prótons, pelo que irão ficar carregados negativamente e ser analisados no modo negativo. Os esfingolípídeos básicos, com maior tendência a ganhar prótons, são analisados no modo positivo. A fonte de ionização, ESI, tem a vantagem de tanto poder ionizar moléculas em íões positivos ou negativos (modo positivo/modo negativo), todavia os espectros obtidos serão totalmente diferentes quer num modo quer noutro [82]. Os glicosfingolípídeos, em ESI no modo positivo, na presença de íões metálicos alcalinos podem produzir predominantemente íões de aductos metálicos  $[M+\text{Cat}i\tilde{a}o]^+$ , onde catião (Cat) =  $K^+$ ,  $Na^+$  ou  $Li^+$  [16]. Os glicolípídeos acídicos, não derivatizados, no modo ESI positivo formam principalmente íões  $[M+H]^+$  [59,60]. No entanto os glicosfingolípídeos acídicos, também conhecidos como gangliósidos, moléculas naturalmente carregadas negativamente (pois têm tendência a perder prótons devido ao grupo carboxílico no ácido siálico [91]), o processo de ionização no modo negativo é facilitado. Tornando assim, nestes casos, a seleção do modo negativo a mais adequada [91]. Os gangliósidos, no modo negativo, produzem predominante íões do tipo  $[M-H]^-$ ,  $[M-CH_3]^-$  ou  $[M-nH]^{n-}$ , dependendo da composição do solvente [59,60].

Para uma análise em *electrospray* a amostra necessita de estar no estado líquido [82] e portanto à amostra de esfingolípídeos é adicionado um solvente orgânico, como por exemplo o metanol. A solução a analisar de esfingolípídeos com um solvente orgânico, mais volátil que o analito, é então infundida dentro da fonte de íões de um espectrómetro de massa através de uma agulha de metal (mantida em alto potencial positivo ou negativo) [90]. Na ponta da agulha, devido ao potencial aplicado a solução é dispersa em um aerossol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas [90], íões  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$  ou aductos metálicos  $[M+\text{cat}i\tilde{a}o]^+$ , onde Cat =  $K^+$ ,  $Na^+$  ou  $Li^+$ . Após libertação das gotículas da agulha, uma corrente de fluxo de gás inerte aquecido é aplicada, geralmente azoto, neste ponto as gotículas de solvente vão se evaporando enquanto que as gotículas do analito sofrem divisão. Com a diminuição do volume de gotículas até a um valor próximo do limite de instabilidade Rayleigh, as gotículas carregadas dividem-se em gotículas mais pequenas. Devido à força de Coloumb os íões moleculares, com a mesma carga, repelem-se uns aos outros. Fazendo com que as gotículas se dividam em gotículas

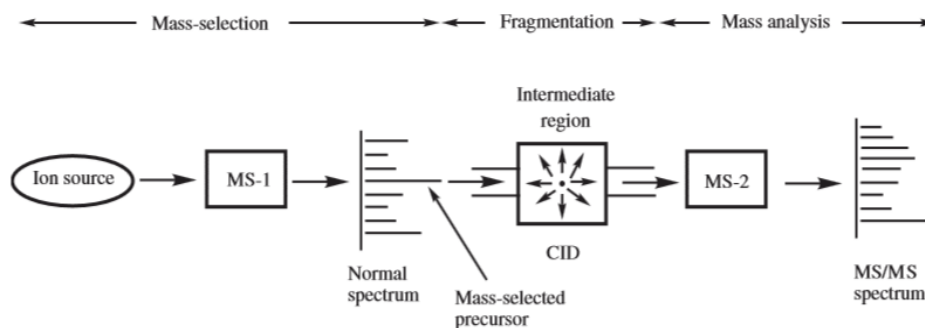
cada vez mais pequenas, até que o solvente seja completamente evaporado e cada gotícula corresponda a uma molécula com carga (figura 18) [92,93].

As moléculas carregadas formados por ESI são depois transportadas para o(s) analisador(es). Os analisadores mais frequentemente utilizados no espectrómetro de massa são: o quadrupolo (Q), o tempo de voo (TOF), a trapa de iões (do inglês “*ion trap*”), e analisadores de alta resolução denominados orbitrap e *Fourier transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR) [85]. Estes analisadores podem ser exclusivos no espectrómetro de massa ou estar combinados com outros, tais como Q-TOF (analisador quadrupolo e tempo de voo), instrumentos triplo quadrupolo (três quadrupolos em série) e Q-*trap* (quadrupolo e um *ion trap*) [83].

No entanto a informação estrutural que pode ser obtida de um espectro de massa com uma fonte de ionização soft ESI (ESI-MS) é reduzida. Esta desvantagem pode ser superada pela utilização de espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS).

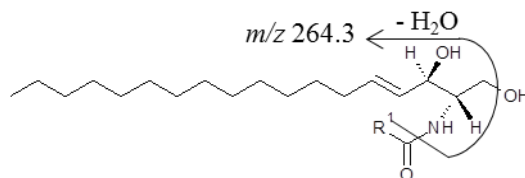
#### 1.4.2. Espectrometria de massa tandem (MS/MS)

Em espectrometria de massa tandem a informação estrutural do ião molecular é obtida pelo recurso à fragmentação do próprio ião molecular precursor em iões produto [55]. Em MS/MS, a fragmentação do ião molecular selecionado é induzida pela colisão do ião com um gás inerte. Consoante o ião molecular selecionado a via de fragmentação e os iões produto resultantes da fragmentação serão distintos. Esta fragmentação dos iões da amostra é então possível, pela exposição destes a um processo denominado dissociação induzida por colisão (CID) [55]. A espectrometria de massa tandem ocorre assim por um processo de várias fases sequenciais esquematizadas na figura 19 [55,83].



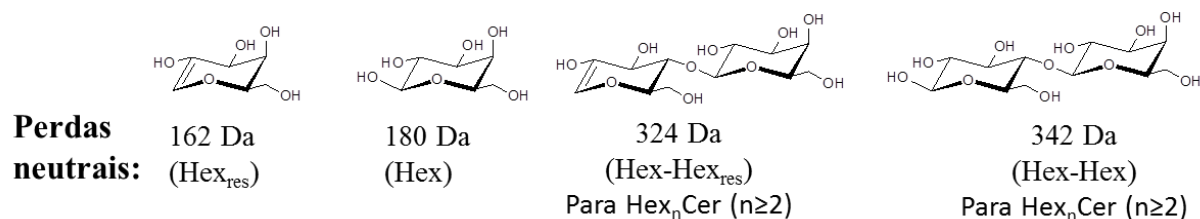
**Figura 1-19:** Conceitos fundamentais da espectrometria de massa tandem [83].

MS/MS fornece informação detalhada e complementar a MS necessária para caracterizar estruturalmente os lípidos. Para cada classe de lípidos existem iões produto e iões produto resultantes de perdas neutras características dessa mesma classe. Neste sentido, *scan* de iões produto (PSI) e *scan* de perdas neutras (NL) são largamente usados na deteção, quantificação e identificação das espécies lipídicas presente em misturas complexas de lípidos [94]. PSI e NL têm assim sido úteis na caracterização do perfil lipídico de células, tecidos e fluídos biológicos de indivíduos normais e doentes. Nesta secção faremos uma leve abordagem aos iões produto e perdas características da classe lipídica que iremos estudar, os esfingolípido. Os esfingolípido mais simples, como previamente referido, são as ceramidas. Nos espectros de MS/MS, no modo positivo, de iões moleculares protonados de ceramidas, iões  $[M+H]^+$ , revelaram abundantes iões produto resultantes da quebra da ligação amida, ou seja, a base esfingóide e iões produto resultantes da desidratação da respetiva base esfingóide [95]. Estes iões produto fornecem informação em relação ao número de átomos de carbono da cadeia, grau de hidroxilação, insaturação, ou outra modificação estrutural da base esfingóide (exemplo: esfingosina de  $m/z$  282, esfingosina desidratada de  $m/z$  264; esfinganina de  $m/z$  266). O conhecimento sobre a composição da base esfingóide e o  $m/z$  do ião molecular precursor, permite a dedução da identidade do ácido gordo presente na ceramida.



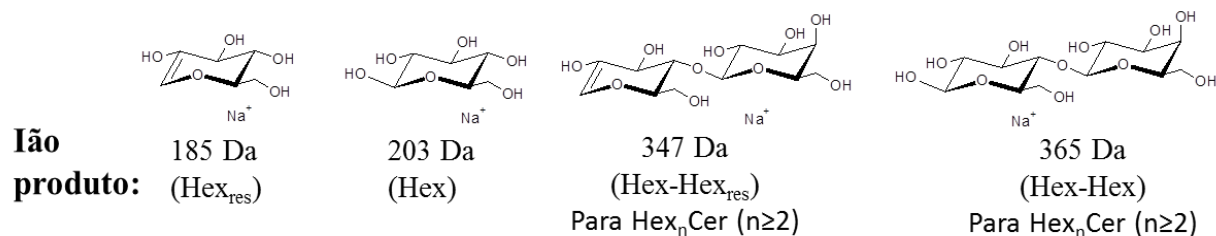
**Figura 1-20:** O ião produto característico de todos os esfingolípido constituídos pela esfingosina como a sua base esfingóide, como resultado de MS/MS no modo positivo de esfingolípido como iões  $[M+H]^+$ . Ião produto de  $m/z$  264, correspondente à esfingosina desidratada (menos duas moléculas de água).

Os espectros de MS/MS de iões moleculares protonados de GSLs, iões  $[M+H]^+$ , revelaram sofrer dissociação por duas maneiras distintas: quebra na(s) ligação(ões) glicosídica(s) com a retenção da carga na ceramida e portanto a perda de hidratos de carbono como espécie(s) neutra(s) (NL: Hex<sub>res</sub> (-162 Da), Hex (-180 Da), Hex-Hex<sub>res</sub> (-324 Da), Hex-Hex (-342 Da)) figura 21; quebra dos hidratos de carbono e da cadeia de ácido gordo com retenção de carga na base esfingóide desidratada (exemplo: se a base esfingóide for a esfingosina:  $m/z$  264, PSI: 264 Da) [28], figura 20.



**Figura 1-21: Perdas neutras características dos glicosfingolípidos, como resultado de MS/MS no modo positivo de íons  $[M+H]^+$ .** Para cerebrósidos, com apenas um resíduo de açúcar, perda neutra de Hex<sub>res</sub> (-162 Da), Hex (-180 Da); para Hex<sub>n</sub>Cer (n ≥ 2) são observadas as mesmas perdas neutras que para os cerebrósidos e adicionalmente perdas neutras de Hex-Hex<sub>res</sub> (-324 Da), Hex-Hex (-342 Da).

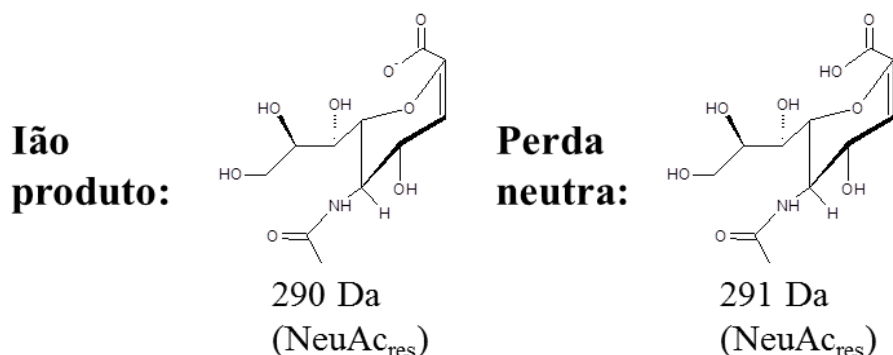
Os espectros de MS/MS de aductos de sódio de GSLs, íons  $[M+Na]^+$ , mostram perdas características similares aos íons protonados, essencialmente as perdas neutras dos hidratos de carbono (-162, -180, -324, -342 Da, dependente do número de hidratos de carbono do GSL em estudo)[28,96]. Adicionalmente, observam-se íons produto correspondentes aos fragmentos das cadeias de hidratos de carbono não modificadas, PSI:  $[Hex_{res}+Na]^+$  (185 Da),  $[Hex+Na]^+$  (203 Da),  $[Hex-Hex_{res}+Na]^+$  (347 Da),  $[Hex-Hex+Na]^+$  (365 Da)[16,28,96], figura 22.



**Figura 1-22: Íões produto característicos dos glicosfingolípidos, como resultado de MS/MS no modo positivo de íons  $[M+Na]^+$ .** Os íões produto característicos dos cerebrósidos, com apenas um resíduo de açúcar, são:  $[Hex_{res}+Na]^+$  (de m/z 185 Da) e  $[Hex+Na]^+$  (de m/z 203 Da); por sua vez os íões produto característicos das Hex<sub>n</sub>Cer (n ≥ 2) são os mesmos íões produto e ainda os:  $[Hex-Hex_{res}+Na]^+$  (de m/z 347 Da),  $[Hex-Hex+Na]^+$  (de m/z 365 Da).

Especificamente para os gangliósidos, que ionizam preferencialmente no modo negativo, os espectros de MS/MS dos seus íões moleculares  $[M-H]^-$  e  $[M-2H]^{2-}$  revelaram que os íões produto mais característicos são: o ácido siálico na forma de resíduo ( $-H_2O$ ), observado com m/z 290 ou o íão produto resultante da respetiva perda neutra do resíduo de ácido siálico (-291 Da)[88], representados na figura 23. Nestes espectros, também são

observados íons produto resultantes da quebra de ligações glicosídicas e da quebra dos anéis dos seus correspondentes hidratos de carbono, como revisto em [97].



**Figura 1-23:** íão produto e perda neutra característica dos gangliósidos, como resultado de MS/MS no modo negativo de íões  $[M-H]^-$  e  $[M-2H]^{2-}$ . Íão produto  $[NeuAc_{res}-H]^-$  de  $m/z$  290 e perda neutra do NeuAc<sub>res</sub> (-291 Da).

Além das enormes vantagens do uso das técnicas de MS e MS/MS na caracterização estrutural dos esfingolípídeos e na caracterização das possíveis alterações estruturais dos esfingolípídeos após oxidação, estas técnicas por si só apresentam ainda algumas limitações, dentro das quais supressão de ionização, interferências de espécies isotópicas e isobáricas, incapacidade de distinguir muitas espécies isoméricas, entre outras [90]. Com o intuito de reduzir algumas destas limitações e para um melhor desempenho destas técnicas, estas têm sido frequentemente e com sucesso acopladas a técnicas cromatográficas, essencialmente à cromatografia de camada fina (TLC) e à cromatografia líquida (LC).

#### 1.4.3. Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida (LC) pode ser aplicada na amostra por si só ou em associação com a espectrometria de massa. Atualmente, a LC é predominantemente acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). A cromatografia líquida é uma técnica que ocorre em fase líquida e tem sido usada na análise de misturas complexas de lípidos. No âmbito dos esfingolípídeos, LC tem sido designadamente usada para a separação de bases esfingóide, bases esfingóide 1-P, esfingomielinas, ceramidas, cerebrósidos, LacCer e GSLs mais complexos [97], como revisto em [60,98]. LC permite a separação e identificação das estruturas dos lípidos da amostra consoante as propriedades químicas dos mesmos, algumas separações seriam indistinguíveis apenas pelo recurso à espectrometria de massa.



Em LC as moléculas de interesse carregadas vão chegando ao detetor a tempos diferentes, uma vez que apresentam diferentes tempos de retenção na coluna devido às suas correspondentes propriedades químicas. É esta variação dos tempos de retenção que permite uma diminuição das possíveis supressões de sinais, às moléculas de interesse, exercidas pelo próprio eluente, contaminantes, e por outros lípidos presentes na amostra [99]. LC é baseada em duas fases: fase normal [97,100] para separar compostos essencialmente pelos seus grupos cabeça (por exemplo, distinguir Cer, GlcCer, LacCer, SM, etc) [60], revisto em [98]. LC em fase reversa [97] tem sido utilizado para separações baseadas no comprimento e saturação das cadeias dos ácidos gordos [60]. Para a separação dos produtos de oxidação de glicosfingolípídeos o LC-MS usando colunas de fase reversa parece a mais indicada, visto que um dos locais nos GSLs mais suscetíveis à oxidação, como anteriormente referido, é na cadeia de ácido gordo mono ou polinsaturado presente na estrutura do GSL.

### 1.5. Objetivos

O desenvolvimento de diversas patologias, em especial as doenças neurodegenerativas, tem sido correlacionado com *stress* oxidativo e com a elevada produção de ROS. Contrariamente à oxidação de fosfolípidos, que tem sido um foco constante de estudo, as publicações sobre a oxidação dos GSLs são praticamente inexistentes. Os glicosfingolípidos são bastante diversificados estruturalmente e exercem inúmeras funções importantes no organismo, essencialmente no SNC, onde se localizam em maiores concentrações e onde o sistema antioxidante se encontra mais debilitado [5]. Desta forma, torna-se relevante avaliar as possíveis alterações estruturais que ocorrem nos GSLs induzidas por reações de oxidação radicalar. Assim, o objetivo desse estudo foi identificar e caracterizar os produtos de oxidação de diferentes glicosfingolípidos (C24:1GalCer e C16:0GalCer, C24:1LacCer) e um gangliósido (GM1) expostos ao radical hidroxilo, uma das ROS mais reativas *in vivo*, produzido via reação de Fenton. Os produtos de oxidação foram caracterizados através de técnicas de espectrometria de massa, nomeadamente ESI-MS e ESI-MS/MS, utilizando diferentes analisadores e utilizando técnicas cromatográficas de separação de lípidos (LC-MS, LC-MS/MS).



---

## Capítulo 2.

---

Material e Métodos





## 2. Material e métodos

### 2.1. Reagentes

A D-galactose- $\beta$ -1,1' N-palmitoil-D-eritro-esfingosina (C16 Galactosil( $\beta$ ) Ceramida, d18:1/16:0), a D-galactose- $\beta$ -1,1' N-nervonoil-D-eritro-esfingosina (C24:1 Galactosil( $\beta$ ) Ceramida, a d18:1/24:1(15Z)), D-lactosil- $\beta$ 1-1'-N-nervonoil-D-eritro-esfingosina (C24:1 Lactosil( $\beta$ ) Ceramida, d18:1/24:1) e o gangliósido GM1 foram obtidos de *Avanti Polar Lipids*, Inc. (Alabaster, AL, USA) e usados sem qualquer purificação adicional. GM1 era composto por uma mistura de dois compostos: Neu5Ac $\alpha$ 2-3(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer (GM1, ceramida d18:1/C18:0), e Neu5Ac $\alpha$ 2-3(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer (GM1, ceramida d20:1/C18:0) que não puderam ser eficientemente separados. O clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) (grau HPLC) e o metanol (MeOH) (grau HPLC) foram usados sem qualquer purificação adicional.

### 2.2. Preparação de lipossomas

Antes da oxidação dos esfingolípidos, por reação de Fenton, foram preparados lipossomas multilamelares. As amostras foram previamente diluídas numa mistura de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1), com uma concentração final de 1.00 mM. Com o intuito de formar as vesículas lipídicas, o solvente foi completamente evaporado sob um fluxo de azoto. A camada fina de lípido seco resultante, na parede do balão de fundo redondo, foi posteriormente hidratada pela adição de tampão de hidrogenocarbonato de amónio 5mM (pH 7.4). Os métodos utilizados para a formação dos lipossomas foram distintos para os GSLs e para o GM1 (que é composto por um resíduo de ácido siálico que facilita a preparação destes lipossomas).

#### 2.2.1. Glicosfingolípidos (Galactosilceramida e lactosilceramida)

Para os glicosfingolípidos, C24:1GalCer, C16:0GalCer, e C24:1LacCer, as amostras foram vortexadas vigorosamente por 5 min e posteriormente sonicadas por mais 5 min através de um sonicador (Selecta Ultrasons); estes passos foram repetidos duas vezes. As suspensões foram depois incubadas a 55-60°C durante 30 min (para cada 5 min, as

suspensões foram sonicadas durante um minuto e vortexadas mais um min). Passados os 30 min, as suspensões foram vortexadas vigorosamente por 5 min e sonicadas por mais 5 min; estes passos voltaram a ser repetidos duas vezes.

### 2.2.2. Monogangliósido 1 (GM1)

Para a preparação dos lipossomas com o GM1 as amostras foram vortexadas por 10 minutos e sonicadas por mais 15 minutos num banho de ultrassons (Selecta Ultrasons). Por fim as suspensões foram vortexadas por mais 5 minutos.

## 2.3. Oxidação dos glicosfingolípídeos e do GM1 via reação de Fenton

A oxidação de Fenton dos esfingolípídeos foi iniciada pela adição, à suspensão lipídica, de  $\text{FeCl}_2$  a uma concentração final de 40  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a uma concentração final de 50 mM e EDTA a uma concentração final de 40  $\mu\text{M}$ . Posteriormente a mistura foi incubada, no escuro, a 37°C durante 3 dias numa orbital *shaking* a 500 rpm num thermocyclor (marca, modelo). Os produtos de oxidação foram depois identificados por ESI-MS, LC-MS e MS/MS. Os controlos foram preparados pela substituição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$  e EDTA por tampão de hidrogenocarbonato de amónio.

## 2.4. Espectrometria de massa no modo positivo para os GSLs

A extensão da oxidação e a identificação dos novos produtos formados foram monitorizados por ESI-MS no modo positivo, usando um espectrómetro de massa Q-TOF2 (Micromass, Manchester, UK). As amostras foram introduzidas por infusão direta e as condições de ESI foram as seguintes: taxa de fluxo de 10  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , voltagem aplicada na agulha de 3kV, voltagem do cone a 30 kV, temperatura da fonte de 80 °C e temperatura de solvatação de 150 °C. A resolução foi ajustada para cerca de 9000 (FWHM) e o espectro de massa foi adquirido durante 1 minuto. Os espectros de massa tandem foram adquiridos por dissociação induzida por colisão (CID- Collision-induced dissociation) utilizando como gás de colisão o argon (pressão medida na célula de colisão  $3.0 \times 10^{-5}$  Torr. A energia de colisão usada foi entre 25 a 30 eV. O espectro de massa tandem também foi adquirido durante 1 minuto. A aquisição dos dados foi efetuada com um sistema de dados software MassLynx 4.0. A medição das massas exatas, de todos os novos produtos de oxidação, foi



efetuada depois do *lock mass* para o ião  $[M+Na]^+$  de cada GSL não modificado observado nos espectros de ESI-MS.

## **2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massa tandem**

As misturas oxidadas (de GSLs e GM1) foram separadas por HPLC num Sistema HPLC (Waters Alliance 2690) acoplado a um espectrómetro de massa do tipo trapa linear de iões “ion trap” LXQ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

### **HPLC-MS dos glicosfingolípidos (GalCer e LacCer)**

Volumes de 5  $\mu$ L da mistura oxidada, diluída em 70% de acetonitrilo com 0.1% de ácido fórmico, foram introduzidos dentro de uma coluna Supelco Bio Wide Pore C5 (15 cm  $\times$  0.5 mm, 5  $\mu$ m). A fase móvel A era composta por água, com 5% de acetonitrilo e 0.1% de ácido fórmico. A fase móvel B era composta por acetonitrilo, com 0.1% de ácido fórmico. O gradiente de fase móvel foi programado do seguinte modo: as condições iniciais foram 70% de B durante 10 minutos; seguido por um gradiente linear a 100% de B em 10 minutos, o gradiente de 100 % de B foi mantido por mais 10 minutos. O caudal através da coluna foi 25  $\mu$ L.min<sup>-1</sup>, obtida através de um repartidor de caudal pre coluna (Accurate LC Packings, USA) e foi redirecionada para um espectrómetro de massa do tipo trapa linear de iões “ion trap” (LXQ, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) por um capilar (0.350  $\times$  0.150 mm) de 70 cm de comprimento. O espectrómetro de massa, do tipo trapa linear de iões (LXQ Thermo), foi operado no modo positivo. As condições típicas de ESI foram as seguintes: voltagem electrospray 5 kV; temperatura do capilar 275°C e fluxo de gás auxiliar 25 unidades. A aquisição dos dados foi efetuada através do Xcalibur data system (V2.0, Thermo)

### **HPLC-MS do Gangliósido (GM1)**

Volumes de 5  $\mu$ L da mistura oxidada (26  $\mu$ g) diluída em 80 % de fase móvel A (80  $\mu$ L), foram introduzidas na coluna Supelco Bio wide pore C5 (15 cm  $\times$  0.5 mm, 5  $\mu$ m). O gradiente de fase móvel foi programado do seguinte modo: as condições iniciais foram 80 % de A por 5 min, 5-20 min gradiente linear a 50 % de B, 20-40 min gradiente linear a 100 % de B mantido por mais 5 min, 45-55 min gradiente linear a 80 % de A mantido por 10 min. O caudal através da coluna foi de 16  $\mu$ Lmin<sup>-1</sup> e foi redirecionada para um espectrómetro de massa do tipo trapa linear de iões “ion trap” (LXQ, Thermo Finnigan,

San Jose, CA, USA) por um capilar ( $0.350 \times 0.150$  mm) de 70 cm de comprimento. Imediatamente antes de entrar no espectrômetro de massa foi adicionado metanol com uma taxa de fluxo de  $10 \mu\text{Lmin}^{-1}$  e misturado com a amostra. O espectrômetro de massa “ion trap” LXQ (Thermo-Finnigan, San Jose, CA) foi operado no modo de íão negativo. As condições típicas de ESI foram as seguintes: voltagem electrospray 4.7 kV; temperatura do capilar  $275^{\circ}\text{C}$  e fluxo de gás auxiliar 25 unidades. A aquisição dos dados foi efetuada através do Xcalibur data system (Thermo, versão 2.0)

### **MS/MS dos produtos de oxidação observados em HPLC-MS**

Para obter o espectro dos íões produto dos maiores componentes durante a corrida de LC foram repetidos continuamente ciclos consistindo na aquisição de um varrimento de MS, seguido de três varrimentos de MS/MS adquiridos no modo automático “data-dependent” com as seguintes configurações de exclusão dinâmica: número de repetições 3; duração da repetição 30 s; duração de exclusão 45 s. A aquisição dos dados foi efetuada num Xcalibur data system (versão 2.0)

### **2.6. Análises de espectrometria de massa e espectrometria de massa Tandem com um analisador Q.Exactive orbitrap, no modo negativo, para o GM1**

A extensão da reação de oxidação do GM1 e a identificação dos novos produtos formados, para a determinação elementar da composição, foram monitorizados por ESI-MS num espectrômetro de massa do tipo Q Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap (Thermo Firsher Scientific, Germany) e operado no modo negativo, com uma voltagem electrospray de 2.7 kV. O espectrômetro de massa do tipo Q Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap (Thermo Firsher Scientific, Germany), foi interfaceado com uma fonte de íões H-ESI II, para a medição das massas exatas dos produtos de oxidação da amostra de GM1 sob condições de Fenton. Amostras não oxidadas e oxidadas do GM1, com uma concentração aproximadamente de  $6 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ , foram dissolvidas em MeOH puro e introduzidas por infusão direta com uma taxa de fluxo de  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  dentro de uma fonte ESI. As condições típicas de ESI foram as seguintes: gás de azoto com um caudal de 5 (unidades arbitrárias); gás auxiliar de azoto com 1 unidade arbitrária; temperatura do capilar  $250^{\circ}\text{C}$ , S-lentes RF nível 50 e uma sonda de temperatura aquecida a  $50^{\circ}\text{C}$ . O método de aquisição foi em full scan com uma resolução de 140 000, durante as experiencias em full-scan a variação de

$m/z$  foi de 400-2000. O controle automático de ganho (AGC) de  $3 \times 10^6$  e o tempo de injeção máximo (IT) foi de 100 ms. O sistema Q Exactive foi ajustado e calibrado no modo negativo usando picos de massa conhecidos de uma solução de calibração (Thermo Scientific) para atingir uma exatidão de massa de  $< 0.5$  ppm RMS. Espectros foram analisados por um *software* de aquisição dos dados XCalibur version 3.0.63 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

Para obter os espectros dos iões produtos durante análises de ESI-MS/MS, os iões precursores selecionados foram isolados por um quadrupolo, e enviados para fragmentação para uma célula de colisões HCD via uma C-Trap. No modo de MS/MS a resolução máxima do analisador Orbitrap foi de 70.000 FWHM, AGC de  $5 \times 10^5$ , IT máximo 120 ms, janela isolamento  $1.0 m/z$  e NCE (energia de colisão) foi entre 25 a 35 eV.



---

## Capítulo 3.

---

Glicosfingolípidos e *stress* oxidativo: estudo da oxidação, via radical hidroxilo, de galactosil e lactosilceramidas por espectrometria de massa



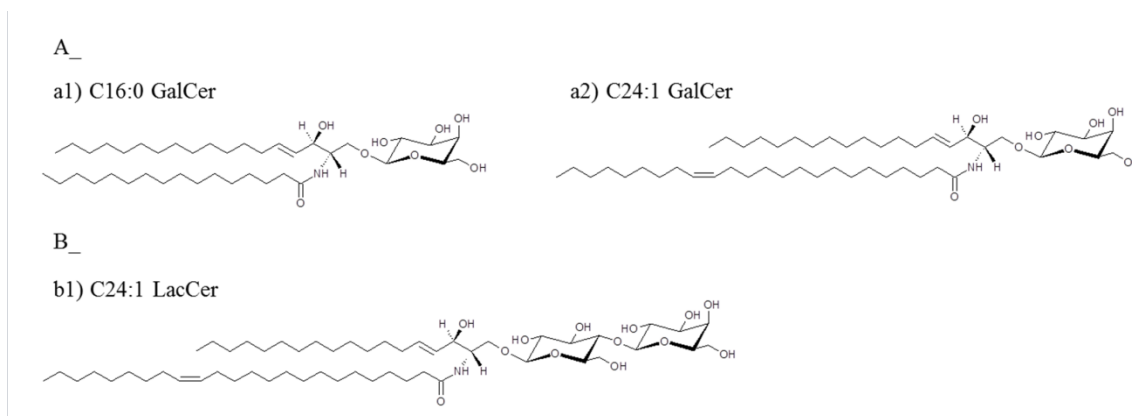
### 3. Glicosfingolípídeos e *stress* oxidativo: estudo da oxidação, via radical hidroxilo, de galactosil e lactosilceramidas por espectrometria de massa

Os glicosfingolípídeos (GSLs) têm inúmeras funções, entre as quais se incluem a participação em processos de sinalização celular, na adesão celular e na transdução de sinal. Estão localizados em maiores concentrações no sistema nervoso e nas bainhas de mielina onde exercem importantes funções no desenvolvimento e maturação do cérebro. O *stress* oxidativo e a oxidação lipídica têm sido associados às doenças neurodegenerativas, todavia o nosso conhecimento sobre a relação entre o *stress* oxidativo e as modificações estruturais induzidas nos GSLs é praticamente nula. Assim, para se avaliar as possíveis alterações estruturais nos GSLs sob oxidação, estudou-se a suscetibilidade *in vitro* de dois GSLs, uma galactosilceramida saturada (C16:0GalCer) e uma galactosilceramida insaturada (C24:1GalCer) e uma lactosilceramida insaturada (C24:1LacCer). As modificações oxidativas induzidas pelo radical hidroxilo, formado por via reação de Fenton, foram monitorizadas por análises diretas por espectrometria de massa electrospray (ESI–MS) e por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC–MS). Os detalhes estruturais dos produtos de oxidação foram caracterizados por espectrometria de massa tandem (ESI–MS/MS e LC–MS/MS).

#### 3.1. Resultados

##### 3.1.1. Espectrometria de massa de ionização por Electrospray na análise de galactosil e lactosilceramidas não oxidadas e oxidadas

A oxidação, induzida pelo radical hidroxilo produzido sobre condições da reação de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ) (ver capítulo 2), de galactosil e lactosilceramidas foi monitorizada por ESI-MS e LC-MS no modo positivo e as espécies oxidadas observadas foram caracterizadas por espectrometria de massa tandem (MS/MS). As espécies moleculares estudadas de GalCer (saturada e insaturada) e de LacCer (insaturada) foram as seguintes (Figura 1): **(A)\_a1** C16:0GalCer: D-galactosil- $\beta$ -1,1' *N*-nervonoil-D-*eritro*-esfingosina (GalCer; d18:1/C16:0); **(A)\_a2** C24:1GalCer: D-galactosil- $\beta$ -1,1' *N*-palmitoil-D-*eritro*-esfingosina (GalCer; d18:1/C24:1(15Z)) e **(B)\_b1** C24:1LacCer: D-lactosil- $\beta$ -1,1' *N*-nervonoil-D-*eritro*-esfingosina (LacCer; d18:1/C24:1(15Z)).

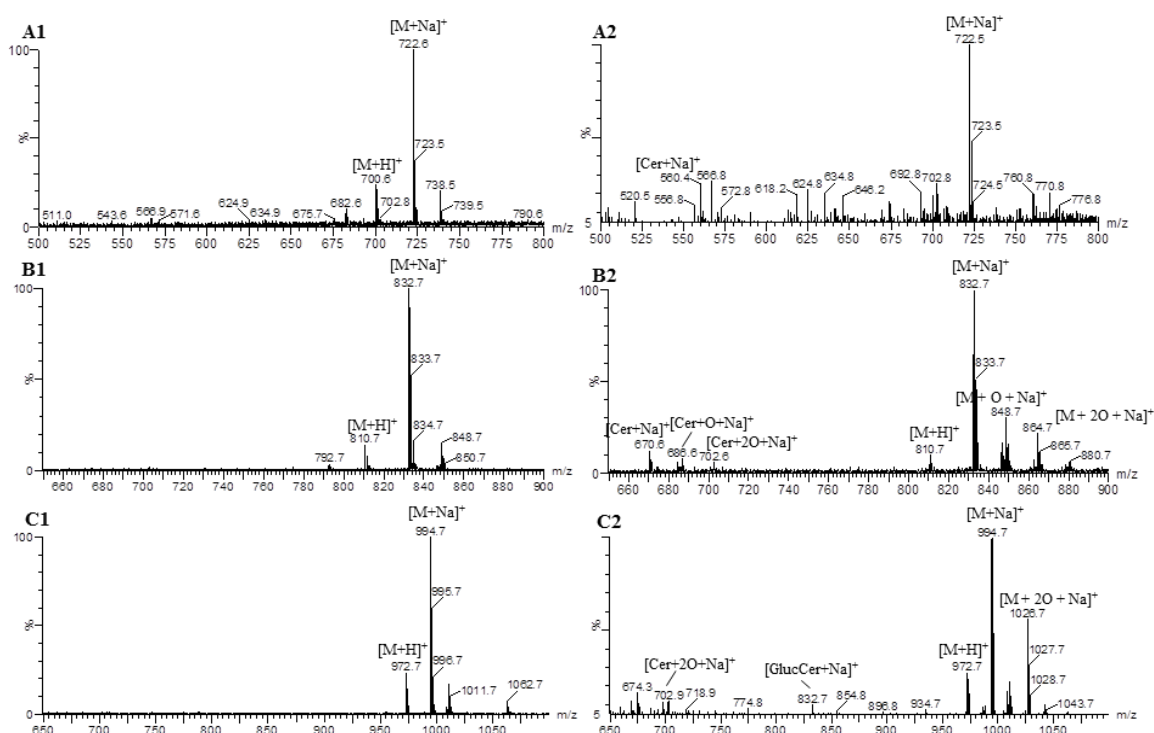


**Figura 3-1: Estrutura molecular das galactosil- e lactosilceramidas estudadas.** (A\_a1) D-galactosil- $\beta$ -1,10 *N*-palmitoil-D-eritro-esfingosina (C16GalCer; d18:1/16:0); (A\_a2) D-galactosil- $\beta$ -1,10 *N*-nervonoil-D-eritro-esfingosina (C24:1GalCer; d18:1/24:1(15Z)); e (B\_b1) D-lactosil- $\beta$ -1,10 *N*-nervonoil-D-eritro-esfingosina (C24:1LacCer; d18:1/ 24:1(15Z)).

Os espectros de massa ESI-MS de C16:0GalCer, C24:1GalCer e C24:1LacCer adquiridos em condições não oxidativas, foram caracterizados pela presença dos seguintes iões moleculares:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$  (figura 2). Sob oxidação, induzida pela reação de Fenton, foram observados nos espectros de ESI-MS de C24:1GalCer e C24:1LacCer, iões caracterizados pela presença de alterações de massa de +14 Da, +16 Da e +32 Da, relativamente aos iões  $[M+Na]^+$  e  $[M+H]^+$ , como resumido na tabela 1 e na figura 2. Estas alterações de massa são indicativas da formação de derivados ceto, hidroxí e hidroperoxi. Estes produtos de oxidação não foram detetados para a GalCer saturada, isto é, para a C16:0GalCer (figura 2 (A2)), sugerindo, assim, que a oxidação ocorre na cadeia de ácido gordo monoinsaturada da C24:1GalCer e C24:1LacCer, ao invés de ocorrer na proximidade da dupla ligação da cadeia de esfingosina. Adicionalmente, nos espectros de massa da C24:1GalCer e C24:1LacCer oxidada (figura 2 (B2) e (C2)), observámos iões com baixos valores de  $m/z$  quando comparados com os GSLs não modificados, os quais foram designados como ceramidas e ceramidas oxidadas, nomeadamente os iões  $[Cer+O-2Da+Na]^+$  e  $[Cer+O+Na]^+$ , apenas detetados no espectro de massa da C24:1GalCer oxidada (tabela 1), e o ião  $[Cer+2O+Na]^+$ , observado nos espectros de ambas as espécies moleculares insaturadas oxidadas (tabela 1). Ainda, no espectro de massa da C24:1LacCer oxidada (figura 2 (C2)) observámos o ião de  $m/z$  832.7, designado como  $[C24:1GlcCer+Na]^+$ , que resultou, provavelmente, da quebra oxidativa da ligação glicosídica entre os dois resíduos de lactose, com a perda do resíduo neutro de galactose



(tabela 1). Estas observações estão em concordância com estudos prévios que suportam a ocorrência de quebras oxidativas de ligações glicosídicas em pequenos oligossacarídeos, devido à oxidação induzida por radicais (reação de Fenton) [13,87]. Estas observações foram validadas pela medição das massas exatas (ver tabela 2), que confirmaram a composição molecular proposta para os produtos de oxidação. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa Tandem (LC-MS/MS) foi seguidamente utilizada para reconfirmar a identidade dos produtos de oxidação acima mencionados.



**Figura 3-2: Monitorização da oxidação induzida pelo radical hidroxilo de galactosil e lactosilceramidas por QTOF-ESI-MS.** Comparação do espectro de massa de ESI-MS da C16:0GalCer (A1), C24:1 GalCer (B1) e C24:1 LacCer (C1) não oxidada e após a oxidação com identificação das correspondentes espécies oxidadas C16:0 GalCer (A2), C24:1 GalCer (B2) e C24:1 LacCer (C2) formadas sob condições de reação de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ).

**Tabela 3-1: Produtos de oxidação de galactosil- e lactosilceramidas detetados por ESI-MS.**

Todos os iões identificados são designados com os seus respetivos valores de  $m/z$ .

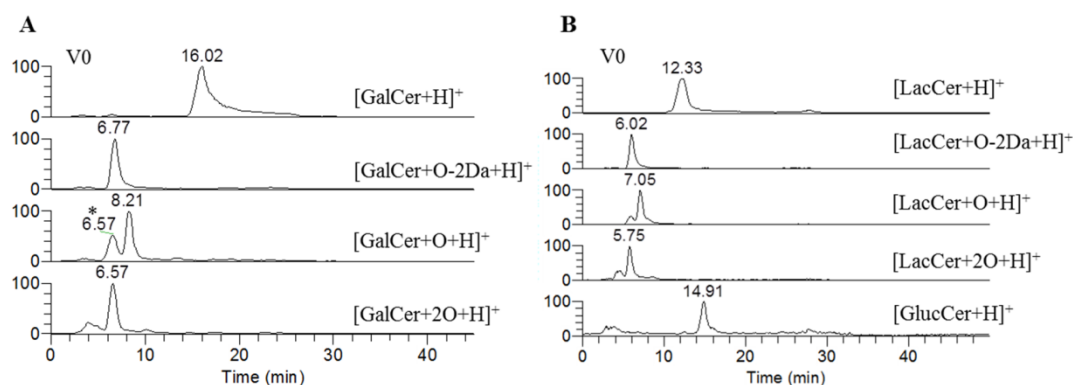
Glicosfingolípidos (GSLs)	C24:1 GalCer	C24:1 LacCer	C16:0 GalCer
$[M+H]^+$	810.7	972.7	700.6
<b>Produtos de oxidação</b>			
$[M+O-2Da+H]^+$	824.7	986.8	
$[M+O+H]^+$	826.7	988.8	
$[M+2O+H]^+$	842.7	1004.7	
<b>Glicosfingolípidos (GSLs)</b>			
$[M+Na]^+$	832.7	994.7	722.6
<b>Produtos de oxidação</b>			
$[M+O-2Da+Na]^+$	846.7	1008.7	
$[M+O+Na]^+$	848.7	1010.7	
$[M+2O+Na]^+$	864.7	1026.7	
$[GlcCer+Na]^+$		832.7	
$[Cer+Na]^+$	670.6	670.6	560.4
$[Cer+O-2Da+Na]^+$	684.6		
$[Cer+O+Na]^+$	686.6		
$[Cer+Na+2O]^+$	702.6	702.9	

Foi efetuada a análise de HPLC-MS utilizando uma coluna de C5 em fase reversa e recorrendo à análise de MS no modo positivo (ver capítulo 2), da C24:1GalCer oxidada e C24:1LacCer oxidada para investigar a presença de produtos de oxidação isoméricos. A C24:1GalCer e C24:1LacCer, bem como os seus produtos de oxidação foram observados nos espectros de HPLC-MS como iões  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ . Os cromatogramas reconstruídos dos iões (RICs) dos glicosfingolípidos oxidados  $[GSL+O-2Da+H]^+$ ,  $[GSL+O+H]^+$ ,  $[GSL+2O+H]^+$  e GlcCer  $[GlcCer+H]^+$ , mostram que cada produto oxidado eluiu num único pico, sugerindo a ausência de espécies isoméricas (figura 3). Os espectros de HPLC-MS/MS dos iões  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  foram adquiridos no modo automático “data-dependent” e analisados a fim de obter maior conhecimento sobre as estruturas dos GSL oxidados.

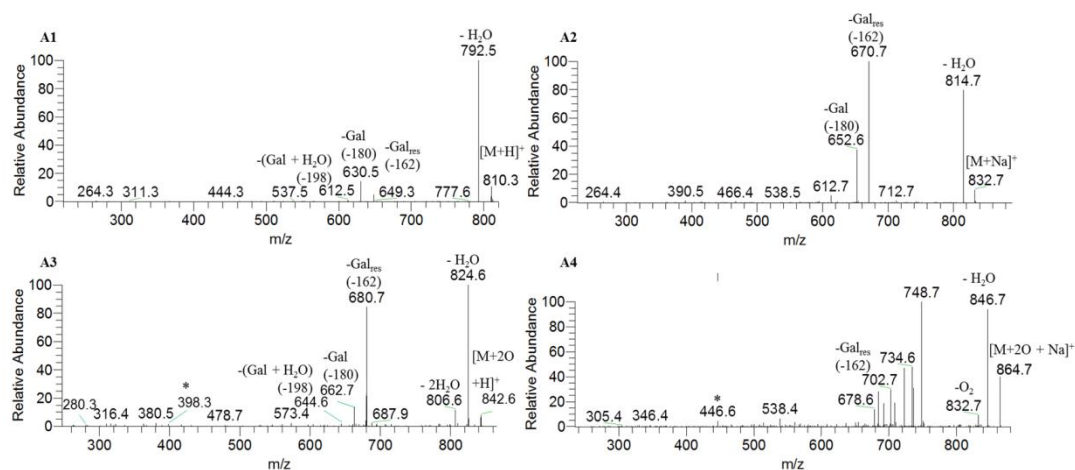
**Glicosfingolípidos e *stress* oxidativo: estudo da oxidação, via radical hidroxilo, de galactosil e lactosilceramidas por espectrometria de massa**

**Tabela 3-2: Medição das massas exactas dos novos iões detectados, por ESI-MS, após oxidação.** Todos os iões são designados com a sua fórmula prevista, massa observada, massa calculada e erro de massa medida.

Produtos de oxidação de aductos de sódio	Fórmula prevista	Massa observada (Da)	Massa calculada (Da)	Erro (mDa)	Erro (ppm)
<b><u>Produtos de oxidação da C24:1GalCer</u></b>					
<b>C24:1GalCer +O-2Da</b>	C <sub>48</sub> H <sub>89</sub> NNaO <sub>9</sub>	846.6495	846.6435	6.0	7.1
<b>C24:1 GalCer +O</b>	C <sub>48</sub> H <sub>91</sub> NNaO <sub>9</sub>	848.6550	848.6592	-4.2	-4.9
<b>C24:1GalCer+2O</b>	C <sub>48</sub> H <sub>91</sub> NNaO <sub>10</sub>	864.6541	864.6541	0.0	0.0
<b>C24:1Cer (-Gal<sub>res</sub>)</b>	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> NNaO <sub>3</sub>	670.6246	670.6114	13.2	19.7
<b>C24:1Cer +O-2Da</b>	C <sub>42</sub> H <sub>79</sub> NNaO <sub>4</sub>	684.5848	684.5907	-5.9	-8.6
<b>C24:1Cer +O</b>	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> NNaO <sub>4</sub>	686.6076	686.6063	1.3	1.8
<b>C24:1Cer +2O</b>	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> NNaO <sub>5</sub>	702.6106	702.6012	9.4	13.3
<b><u>Produtos de oxidação da C24:1LacCer</u></b>					
<b>C24:1LacCer+O-2Da</b>	C <sub>54</sub> H <sub>99</sub> NNaO <sub>14</sub>	1008.6884	1008.6963	-7.9	-7.9
<b>C24:1LacCer+O</b>	C <sub>54</sub> H <sub>101</sub> NNaO <sub>14</sub>	1010.7131	1010.7120	1.1	1.1
<b>C24:1LacCer +2O</b>	C <sub>54</sub> H <sub>101</sub> NNaO <sub>15</sub>	1026.7166	1026.7069	9.7	9.5
<b>24:1GlcCer</b>	C <sub>48</sub> H <sub>91</sub> NNaO <sub>8</sub>	832.6672	832.6642	3.0	3.6



**Figura 3-3: Análise LC-MS dos produtos de oxidação da C24:1GalCer e C24:1LacCer.** (A) Cromatogramas reconstruídos dos iões  $[C24:1GalCer + H]^+$  de  $m/z$  810.3 designado como GalCer não modificada,  $[C24:1GalCer + O-2Da + H]^+$  de  $m/z$  824.8 designado como derivado ceto,  $[C24:1GalCer + O + H]^+$  de  $m/z$  826.8 que corresponde ao derivado hidroxí e  $[C24:1GalCer + 2O + H]^+$  de  $m/z$  842.6 que corresponde ao derivado hidropéroxí. (B) Cromatogramas reconstruídos dos iões  $[C24:1LacCer + H]^+$  de  $m/z$  972.8 designado como LacCer não modificada,  $[C24:1LacCer + O-2Da + H]^+$  de  $m/z$  986.8 designado como derivados ceto,  $[C24:1LacCer + O + H]^+$  de  $m/z$  988.7 que corresponde aos derivados hidroxí,  $[C24:1LacCer + 2O + H]^+$  de  $m/z$  1004.7 que corresponde aos derivados hidropéroxí,  $[C24:1GlucCer + H]^+$  de  $m/z$  810.3 designado como derivado glucosilceramida. \*contribuição dos iões correspondentes aos derivados ceto da GalCer. V0, volume morto.



**Figura 3-4: Espectros de LC-MS/MS dos iões  $[M + H]^+$ ,  $[M + Na]^+$  e derivados hidropéroxí da C24:1GalCer oxidada.** Espectro LC-MS/MS do ião  $[C24:1GalCer + H]^+$  de  $m/z$  810.3 (A1) e da correspondente espécie oxidada: ião  $[C24:1GalCer + 2O + H]^+$  de  $m/z$  842.6 (A3). Espectro LC-MS/MS do ião  $[C24:1GalCer + Na]^+$  de  $m/z$  832.7 (A2) e da correspondente espécie oxidada: ião  $[C24:1GalCer + 2O + Na]^+$  de  $m/z$  864.7 (A4). \*Estrutura proposta na figura 7.

## Glicosfingolípidos e *stress* oxidativo: estudo da oxidação, via radical hidroxilo, de galactosil e lactosilceramidas por espectrometria de massa

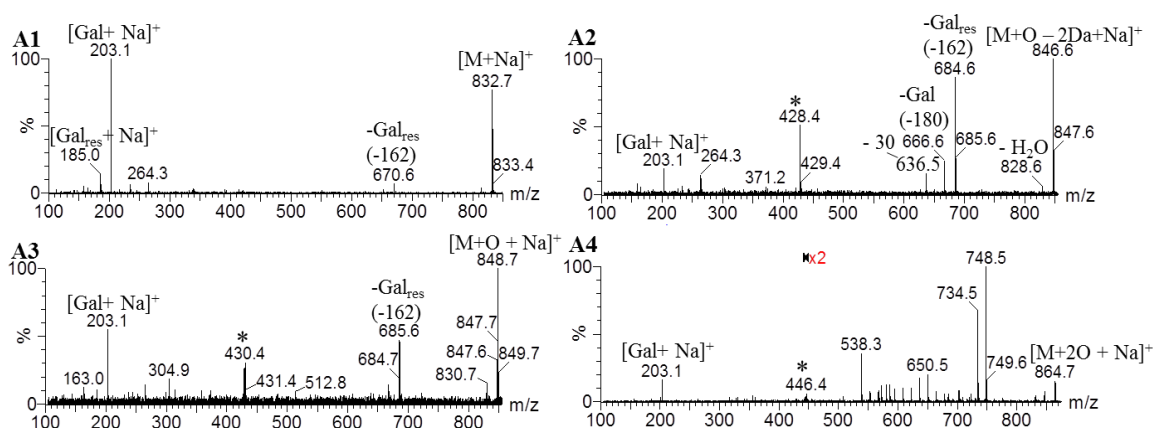
**Tabela 3-3: Principais íões produto observados nos espectros LC-MS/MS dos íões  $[M+H]^+$  dos produtos de oxidação da C24:1GalCer e C24:1LacCer com a indicação dos valores de  $m/z$  e as correspondentes vias de fragmentação mais prováveis. <sup>a</sup> Estrutura identificada na figura 7 (A).**

	C24:1 GalCer $[M+H]^+$			C24:1 LacCer $[M+H]^+$		
	O-2Da (+14)	O (+16)	2O (+32)	O-2Da (+14)	O (+16)	2O (+32)
$[M+H]^+$	824.4	826.8	842.6	986.7	988.7	1004.7
-H <sub>2</sub> O	806.8	808.5	824.6	968.5	970.5	986.6
- 2H <sub>2</sub> O	788.7	790.6	806.6	950.5	952.7	968.5
-Gal <sub>res</sub>	662.8	664.6	680.7	824.4	826.6	842.7
-Gal	644.7	646.6	662.7	806.6	808.7	824.6
-(Gal+H <sub>2</sub> O)	626.8	628.6	644.5	-	790.5	806.6
-(Gal+30)	-	-	-	-	778.5	-
-(Gal+2H <sub>2</sub> O)	-	-	-	-	772.4	-
-(Gal+3H <sub>2</sub> O)	-	-	-	-	754.6	-
-Lac <sub>res</sub>	-	-	-	662.5	664.7	680.6
-Lac	-	-	-	644.4	646.6	662.6
-(Lac+H <sub>2</sub> O)	-	-	-	626.7	628.5	644.5
-(Lac+30)	-	-	-	-	616.6	-
-(FAC24:1+H <sub>2</sub> O)	444.6	-	-	-	-	-
Oxidação do ácido gordo <sup>a</sup>	380.6	382.5	398.3/380.5	380.4	382.3	380.4
Cadeia de esfingosina – 2 H <sub>2</sub> O	-	282.2	282.4	-	-	-
Cadeia de esfingosina – 3 H <sub>2</sub> O	264.4	264.3	264.4	-	-	-

### 3.1.2. Análise por espectrometria de massa tandem da galactosilceramida e lactosilceramida não oxidada e oxidada

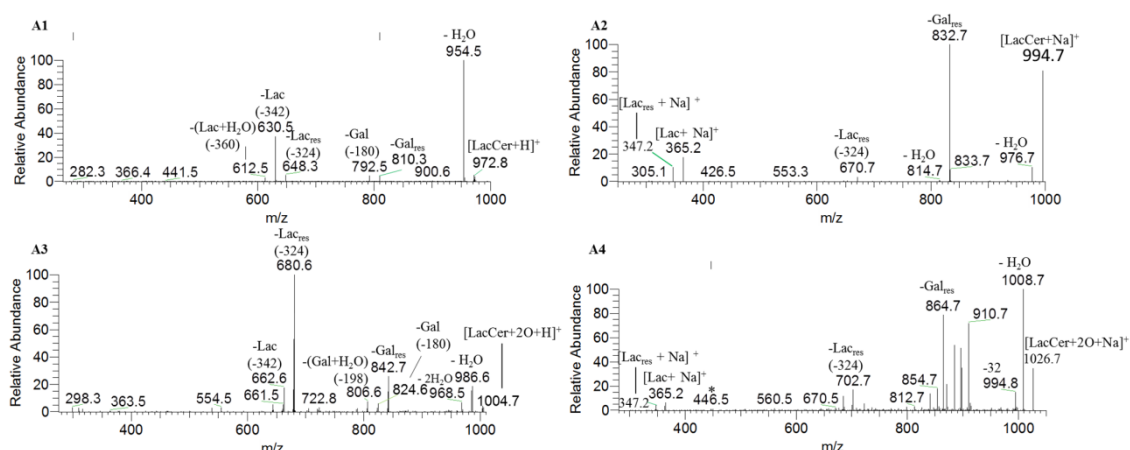
Os espectros de massa tandem dos íões moleculares sodiados e protonados dos produtos de oxidação da C24:1GalCer e C24:1LacCer foram obtidos e comparados com as vias de fragmentação das correspondentes espécies não oxidadas. Todos os espectros de MS/MS dos GSLs oxidados mostraram vias de fragmentação características com a perda de fragmentos neutros da cadeia de hidratos de carbono não modificada. No espectro de MS/MS da C24:1GalCer oxidada observámos a perda neutra de H<sub>2</sub>O, Gal<sub>res</sub> (-162Da), Gal (-180 Da) e a perda combinada de Gal e H<sub>2</sub>O, similarmente ao observado para a C24:1GalCer não modificada, como exemplificada na figura 4 e sumariado na tabela 3. A fragmentação dos íões moleculares sodiados oxidados e não oxidados produziram o característico íão produto  $[Gal+Na]^+$  de  $m/z$  203.1 (galactose não modificada) observado nos espectros de MS/MS obtidos no espectrómetro de massa Q-TOF (figura 5). Todavia, este íão não foi observado nos espectros de MS/MS obtidos com o espectrómetro de massa *ion trap*, uma vez que com este analisador os espectros de MS/MS têm um limite mínimo acima de 1/3 do valor de  $m/z$  do íão precursor. Os espectros de massa tandem dos produtos

de oxidação da C24:1LacCer revelaram perda de H<sub>2</sub>O, Gal<sub>res</sub>, Gal, Gal+nH<sub>2</sub>O (n=1 até 3), Lac<sub>res</sub>, Lac e Lac+H<sub>2</sub>O, análogo ao observado nos espectros de MS/MS da LacCer não modificada (tabela 3). No caso dos aductos de sódio foi possível observar os iões produto [Lac+Na]<sup>+</sup> de *m/z* 365.1 e [Lac<sub>res</sub>+Na]<sup>+</sup> de *m/z* 347.1 (figura 6, tabela 4) e não foram observadas perdas de açúcares modificados. O ião produto de *m/z* 264.4, designado como a cadeia de esfingosina desidratada e inalterada [16,96], foi observado em todos os espectros de MS/MS. O conjunto destas observações indica a presença da cadeia de esfingosina inalterada assim como as correspondentes cadeias de hidratos de carbono inalteradas, sugerindo a ocorrência de oxidação apenas na cadeia de ácido gordo.



**Figura 3-5: Espectros de LC-MS/MS dos iões [M + Na]<sup>+</sup> da C24:1GalCer e seus derivados oxidados.** Espectro de ESI-MS/MS obtido no instrumento Q-TOF- dos iões [C24:1GalCer + Na]<sup>+</sup> da C24:1 GalCer de *m/z* 832.7 (A1) e correspondentes espécies oxidadas: [C24:1GalCer + O - 2Da + Na]<sup>+</sup> de *m/z* 846.6 (A2), [C24:1GalCer + O + Na]<sup>+</sup> de *m/z* 848.7 (A3), [C24:1GalCer + 2O + Na]<sup>+</sup> de *m/z* 864.7 (A4). \*estruturas propostas na figura 7 (B).

## Glicosfingolípidos e *stress* oxidativo: estudo da oxidação, via radical hidroxilo, de galactosil e lactosilceramidas por espectrometria de massa



**Figura 3-6: Espectros de LC-MS/MS dos iões  $[M + H]^+$ ,  $[M + Na]^+$  e derivados hidroperoxi da C24:1 LacCer oxidada.** Espectro LC-MS/MS do ião  $[C24:1LacCer + H]^+$  de  $m/z$  972.8 (A1) e da correspondente espécie oxidada: ião  $[C24:1LacCer + 2O + H]^+$  de  $m/z$  1004.7 (A3). Espectro LC-MS/MS do ião  $[C24:1LacCer + Na]^+$  de  $m/z$  994.7 (A2) e da correspondente espécie oxidada: ião  $[C24:1LacCer + 2O + Na]^+$  de  $m/z$  1026.7 (A4). \*Estrutura proposta na figura 7 (B).

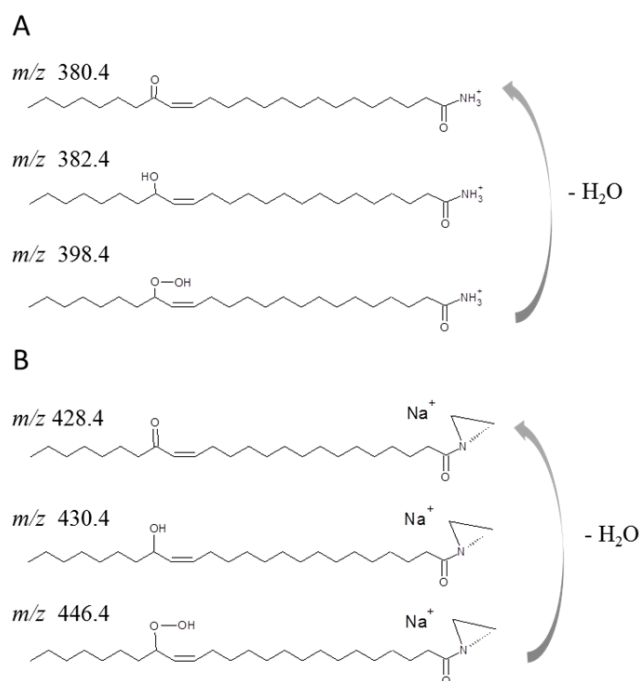
**Tabela 3-4: Principais iões produto observados nos espectros de LC-MS/MS dos iões  $[M+Na]^+$  dos produtos de oxidação de C24:1GalCer e C24:1 LacCer com a indicação dos valores de  $m/z$  e as vias de fragmentação mais prováveis.** <sup>a</sup>Estrutura identificada na figura 7 (B).

	C24:1 GalCer $[M+Na]^+$			C24:1 LacCer $[M+Na]^+$		
	O-2Da (+14)	O (+16)	2O (+32)	O-2Da (+14)	O (+16)	2O (+32)
$[M+Na]^+$	846.7	848.7	864.7	1008.8	1010.8	1026.7
-H <sub>2</sub> O	828.7	830.7	846.7	990.7	992.8	1008.7
-O <sub>2</sub>	-	-	832.7	-	-	994.8
-Gal <sub>res</sub>	684.7	686.6	702.7	846.7	848.7	864.7
-Gal	666.6	668.6	684.7	-	-	-
-(Gal+30)	636.7	638.7	654.7	-	-	-
-Lac <sub>res</sub>	-	-	-	684.7	686.7	702.7
-Lac	-	-	-	666.6	668.7	684.6
-(Lac+30)	-	-	-	636.7	638.8	654.7
Quebra em C14-C15	-	-	708.6	-	-	870.7
Quebra em C15-C16	-	-	722.6	-	-	884.7
Quebra em C15-C16-Gal <sub>res</sub>	-	-	-	-	-	722.7
Quebra em C16-C17	-	-	736.7	-	-	898.7
(derivado hidroxi)	-	-	-	-	-	-
Quebra em C16-C17	-	-	734.6	-	-	896.7
Quebra em C17-C18	-	-	748.7	-	-	910.7
Oxidação do ácido gordo <sup>a</sup>	428.5	430.5	446.6	428.5	430.4	446.5
Cadeia de esfingosina-3H <sub>2</sub> O	264.4	264.5	-	-	-	-
Lac <sub>res</sub>	-	-	-	347.2	347.2	347.2
Lac	-	-	-	365.2	365.2	365.2

Ambas as vias de fragmentação (CID) observadas para os íões precursores  $[M+H]^+$  de C24:1GalCer oxidada e C24:1LacCer oxidada, (figuras 4 e 6), envolvem a quebra da ligação C2-N da cadeia de esfingosina. Estas vias de fragmentação produziram íões diagnóstico de  $m/z$  380.3, 382.3 e 398.3, correspondentes à cadeia de ácido gordo dos derivados cetona, hidroxila e hidroperoxila dos GSL insaturados, respetivamente (estruturas propostas na figura 7 (A)). O íão fragmento de  $m/z$  380.3, observado no espectro de MS/MS do derivado hidroperoxila da C24:1GalCer, surge de uma perda adicional de água do grupo hidroperoxila (398-18), figura 7 (A). O íão fragmento de  $m/z$  444.6 (perda de 380 Da) observado para o derivado cetona da C24:1GalCer surge da perda combinada da cadeia C24:1 de ácido gordo oxidada e  $H_2O$ .

A oxidação na cadeia de ácido gordo foi ainda confirmada pelo estudo das vias de fragmentação dos íões precursores sodiados [101]. Os espectros de HPLC-MS/MS dos íões  $[M+Na]^+$  dos produtos de oxidação de C24:1GalCer e C24:1LacCer (cetona, hidroxila e hidroperoxila) revelaram íões produto de  $m/z$  428.5, 430.5 e 446.5, respetivamente. Estes íões produto foram designados como os íões correspondentes à cadeia de ácido gordo dos derivados cetona, hidroxila e hidroperoxila dos GSL insaturados, respetivamente (tabela 4, figuras 4, 5 e 6), que surgiram da perda combinada da cadeia de hidratos de carbono e a quebra da ligação C3-C4 da cadeia de esfingosina (figura 7 (B)).





**Figura 3-7: Iões produto observados nos espectros de massa tandem da C24:1GalCer oxidada e C24:1LacCer oxidada com a oxidação na respectiva cadeia de ácido gordo (A) Iões produto observados nos espectros de MS/MS dos iões  $[M + H]^+$  dos derivados ceto, hidroxi e hidroperoxi da GalCer/LacCer formados pela quebra da ligação C2–N. (B) Iões produto observados nos espectros de MS/MS dos iões  $[M + Na]^+$  dos derivados ceto, hidroxi e hidroperoxi da GalCer/LacCer. Proposemos a formação destas estruturas pela perda combinada da cadeia de hidratos de carbono e a quebra da ligação C3–C4 da cadeia de esfingosina.**

No espectro de massa de LC-MS/MS, dos derivados hidroperoxi sodiados, foram observados iões fragmento que surgiram da perda de  $O_2$ . Estes iões fragmento de  $m/z$  832.7 para a C24:1GalCer oxidada (figura 4 (A4)) e de  $m/z$  994.8 para a C24:1LacCer oxidada (figura 6 (A4)) corroboram a presença do grupo hidroperóxido. Nestes espectros, foram observados outros iões produto abundantes provenientes da quebra oxidativa na proximidade do grupo hidroperoxi. Estes incluem fragmentações das ligações entre C17–C18, C16–C17, C15–C16 e C14–C15 (figura 8), permitindo-nos sugerir a presença de vários isómeros oxidados com hidroperóxidos em diferentes posições na cadeia de ácido gordo monoinsaturada (C17, C16, C15 e C14). A formação de isómeros posicionais foi previamente observada durante a oxidação de fosfolípidos esterificados com ácido oleico

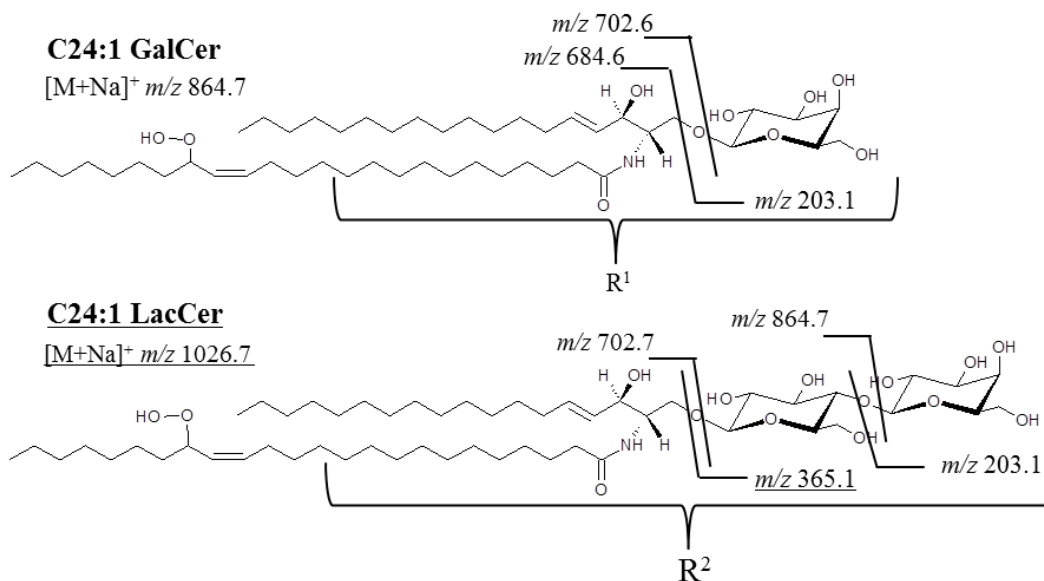
monoinsaturado, particularmente durante a oxidação da fosfatidilcolina por radicais hidroxilo [55,102]. Todos estes dados permitiram-nos sugerir que não ocorreu a modificação estrutural dos resíduos de açúcar e que a oxidação ocorreu principalmente na cadeia de ácido gordo monoinsaturado.

Em todos os espectros de LC-MS/MS de Cer e da Cer oxidada ( $[C24:1Cer+O-2Da+H]^+$ , de  $m/z$  662.5,  $[C24:1Cer+O+H]^+$ , de  $m/z$  664.4 e  $[C24:1Cer+2O+H]^+$ , de  $m/z$  680.6 o ião produto de  $m/z$  264.4 foi observado, designando-se como cadeia de esfingosina inalterada (como previamente referido), confirmando que a oxidação ocorreu na cadeia C24:1 do ácido gordo monoinsaturado. Além disso, nestes espectros também foram observados os iões correspondentes à cadeia de ácido gordo oxidada identificados estruturalmente na figura 7.

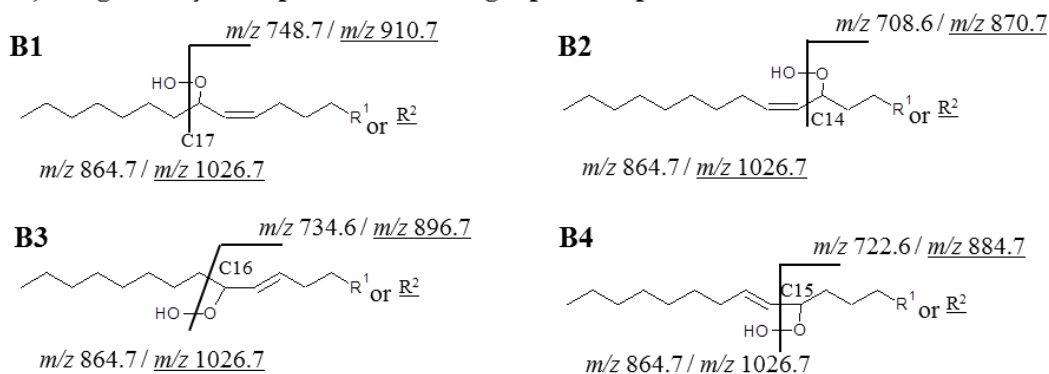
### 3.2. Discussão

No presente trabalho estudou-se a oxidação de GSLs insaturados, GalCer e LacCer, via radical hidroxilo, um dos mais potentes ROS formados *in vivo* [38]. A oxidação de ácidos gordos monoinsaturados, embora não seja tão favorável comparativamente com a oxidação de ácidos gordos polinsaturados [82], foi previamente reportada (através do radical hidroxilo) *in vitro* em sistemas modelo [84,86,102–104]. Além disso, espécies oxidadas derivadas de ácidos gordos monoinsaturados foram também previamente detetadas *in vivo* em mitocôndrias cerebrais não sinápticas [105].

**A) Vias de fragmentação envolvendo a perda da cadeia de hidratos de carbono**



**B) Fragmentação na proximidade do grupo hidropoxi**



**Figura 3-8: Vias de fragmentação dos derivados hidropoxi da C24:1 galactosilceramida e C24:1 lactosilceramida.** (A) vias de fragmentação envolvendo a perda de Gal e Lac dos íons  $[M + 2O + Na]^+$  derivados hidropoxi da C24:1 GalCer (de  $m/z$  864.7) e C24:1 LacCer (de  $m/z$  1026.7); (B) fragmentação na proximidade do grupo hidropoxi da C24:1 GalCer e C24:1 LacCer. Os quatro isômeros correspondentes à oxidação na cadeia C24:1 de ácido gordo estão aqui representados (B1–B4). Íons de  $m/z$  748.7/ 910.7 (B1),  $m/z$  708.6/870.7 (B2), 734.6/896.7 (B3) e  $m/z$  722.6/884.7 (B4) que correspondem à combinada quebra das ligações entre C18–C17, C15–C14, C17–C16 e C16–C15, e, à formação de um terminal aldeído permitindo-nos propor a presença do hidropoxi em C17, C14, C16 e C15, respetivamente.

Os resultados indicaram oxidação na cadeia C24:1 do ácido gordo insaturado resultando na formação de 3 produtos de oxidação diferentes, nomeadamente derivados ceto, hidroxí e hidropoxi, e na formação de ceramidas e ceramidas oxidadas. Quando avaliámos, nas mesmas condições, a C16:0GalCer saturada, apenas observámos produtos

de oxidação formados a partir da perda da cadeia de hidratos de carbono, ou seja, a respetiva ceramida. A oxidação na cadeia de esfingosina não foi detetada para a C16:0GalCer, sugerindo que a oxidação ocorreu na cadeia de ácido gordo monoinsaturado ao invés de ocorrer na dupla ligação da cadeia de esfingosina. Estes resultados estão em concordância com dados prévios reportados por Zhou *et al* [106], sugerindo que a presença do grupo hidroxilo no C3 da cadeia de esfingosina previne a oxidação da sua correspondente dupla ligação. Em estudos prévios foi reportado que a fotoxidação UVA destes GSLs apenas produz derivados hidroperoxi [28], enquanto neste estudo a oxidação de GSLs por reação de Fenton levou à formação de mais produtos de oxidação, como acima mencionado. De acordo com resultados prévios, a irradiação UVA de GalCer e LacCer leva à oxidação preferencial da dupla ligação de esfingosina, favorecendo a adição do oxigénio singuleto [28].

A formação de ceramidas durante a oxidação radicalar de GSLs pode ter várias implicações fisiológicas. As ceramidas são consideradas lípidos bioativos importantes devido ao seu papel em vários processos biológicos, tais como a regulação da proliferação celular e apoptose, entre outros [10,106,107]. Nas situações em que há aumento da produção de ROS, tais como nas doenças neurodegenerativas, o aumento de ceramidas *in situ* pode ocorrer. Uma vez que as ceramidas têm efeitos pro-apoptóticos bem como necróticos, [108] o aumento no conteúdo de ceramidas observado pode promover a neurodegeneração.

A biossíntese dos esfingolípidos é controlada enzimaticamente e as galactosilceramidas e lactosilceramidas são consideradas precursores importantes nesta via biossintética. Deste modo, as modificações estruturais que ocorrem nestes GSLs, pelo *stress* oxidativo podem induzir alterações no metabolismo dos GSLs. Nas membranas de mielina, os galactocerebrósidos correspondem a aproximadamente 20 % do seu conteúdo lipídico. Estes lípidos estão presentes quer no sistema nervosa central (SNC) quer no sistema nervosa periférico (SNP) [68]. Acredita-se que a GalCer transmite propriedades à mielina que são necessárias para uma correta transmissão do pulso nervoso, participa na adesão das superfícies exteriores da mielina, fornece estabilidade e garante as funções dinâmicas das membranas de mielina [10,109]. Foi previamente observado que ratos com a enzima ceramida galactosiltransferase, enzima que sintetiza a GalCer, inibida não modifica

a síntese da mielina, todavia nestes ratos foram detetadas anormalidades na mielina tais como a redução da sua espessura, a formação de vacúolos, a destabilização das junções axo-gliais e a degeneração da mielina [109,110]. Uma vez que a GalCer e os derivados sulfatados da GalCer são necessários para a manutenção e estabilidade da mielina [109,110], este estudo permite-nos sugerir que *in vivo* a oxidação da GalCer pode levar à destabilização das membranas de mielina e consequentemente, promover o desenvolvimento de doenças desmielinizantes. Os GSLs, como moléculas sinalizadoras, contém informação que pode ser útil na deteção de células modificadas, sob *stress* ou infectadas pelo sistema imunitário [21]. Os GSLs podem atuar como moléculas imunoregulatórias e, dependendo da sua estrutura, exibirem capacidade estimulatória ou imunossupressora. A despolimerização dos glicosfingolípídeos mais complexos pode estimular o sistema imune e consequentemente levar à inflamação no sistema nervoso, exacerbando as condições oxidativas e a resposta inflamatória, agravando deste modo a progressão das doenças neurodegenerativas.

### **3.3. Conclusões**

Todos os resultados apresentados neste capítulo sugerem que a C24:1GalCer e a C24:1LacCer podem ser oxidadas por radicais hidroxilo em ambientes aquosos e depois da preparação prévia dos lipossomas, levando à formação de derivados ceto, hidroxil e hidroperoxil. A degradação oxidativa da C24:1LacCer forma adicionalmente o produto C24:1GlcCer. Contrariamente, a falta de ligações duplas ricas em eletrões na cadeia de ácido gordo faz com que C16:0GalCer seja menos sensível à oxidação induzida por reação de Fenton. Os resultados aqui reportados indicam que a oxidação radicalar de GSLs pode ser uma fonte de ceramidas. Estas são conhecidas como moléculas sinalizadoras pro-apoptóticas, e poderão ter efeitos biológicos significativos principalmente nas doenças neurodegenerativas.





---

## Capítulo 4.

---

Avaliação da oxidação não enzimática do GM1 utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massa de alta resolução







#### **4. Avaliação da oxidação não enzimática do GM1 utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massa de alta resolução**

Os gangliósidos são glicosfingolípidos ácidos compostos por uma ceramida hidrofóbica e uma cadeia hidrofílica de hidratos de carbono composta com pelo menos um resíduo de ácido siálico, sendo o mais comum o ácido N-acetil neuramínico, que lhe confere carga negativa a pH neutro. Os gangliósidos estão localizados em membranas celulares, em domínios membranares como os *rafts* lipídicos e são particularmente abundantes no sistema nervoso central. Estes participam na modulação das propriedades da membrana celular, reconhecimento célula-célula, regulação celular e sinalização. Têm sido correlacionados distúrbios no metabolismo dos gangliósidos com o desenvolvimento de doenças, tais como as doenças neurodegenerativas e na inflamação. Estas condições têm em comum a elevada produção das espécies reativas de oxigénio (ROS) que podem induzir alterações na estrutura de biomoléculas incluindo os lípidos, levando à perda da sua função, e favorecendo os processos fisiopatológicos destas doenças. A participação dos fosfolípidos oxidados em doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e doenças associadas à idade e complicações diabéticas é bem conhecida. Em oposição, o conhecimento sobre a oxidação de gangliósidos é inexistente. Assim, para se avaliar a possibilidade de implicação das ROS na estrutura dos gangliósidos, foram usados sistemas modelo biomiméticos *in vitro* para estudar a suscetibilidade do GM1(Neu5Ac $\alpha$ 2-3(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer) à oxidação induzida por ROS. A oxidação do GM1 foi induzida pelo radical hidroxilo produzido sob condições de reação de Fenton e monitorizada por espectrometria de massa de alta resolução com ionização por electrospray e espectrometria de massa tandem (ESI-MS e MS/MS) um instrumento Q-Exactive (Thermo) com um analisador do tipo orbitrap de alta resolução.

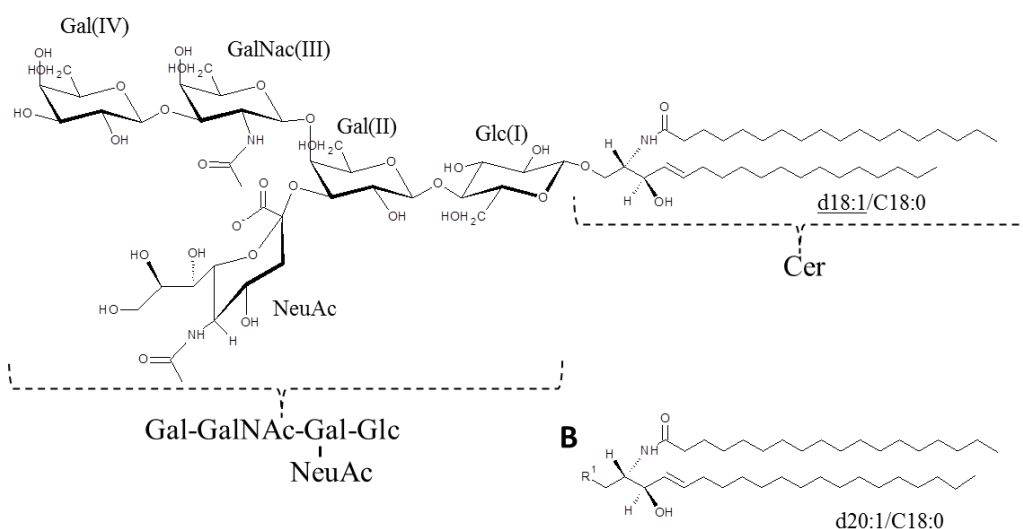
##### **4.1. Resultados**

###### **4.1.1. Espectrometria de massa de ionização por electrospray na análise do GM1 não modificado e oxidado**

A oxidação radicalar, não enzimática, do GM1 foi monitorizada por ESI-MS no modo negativo. Este gangliósido, devido ao seu ácido siálico, ioniza facilmente no modo

negativo formando íons de carga unitária  $[M-H]^-$  [111], de carga dupla  $[M-2H]^{2-}$  [97] e como aductos de cloro  $[M-H+Cl]^{2-}$  [88]. O padrão de GM1 usado para este trabalho era composto por uma mistura de duas espécies moleculares de GM1, representadas na figura 1. Esta mistura era composta por 70% de GM1(d18:1/C18:0) (Neu5Ac $\alpha$ 2-3(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer) e 30% de GM1(d20:1/C18:0), as quais não puderam ser eficientemente separadas. Ambas as espécies moleculares do GM1 foram identificadas no espectro de ESI-MS do GM1 não modificado, pela presença dos íons moleculares  $[M-H]^-$ ,  $[M-H]^{2-}$  e  $[M+Cl-H]^{2-}$ , como representado na figura 2 e descrito na tabela 1.

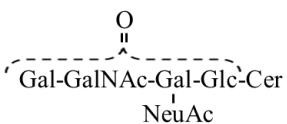
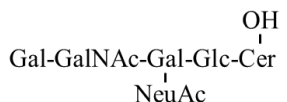
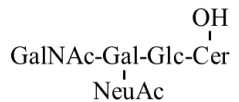
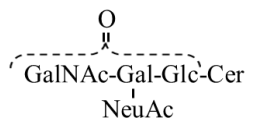



**A**

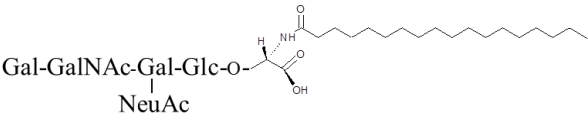
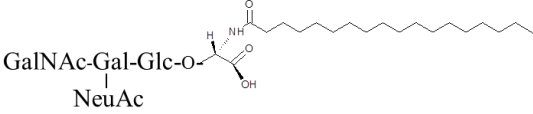
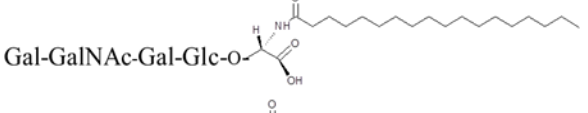
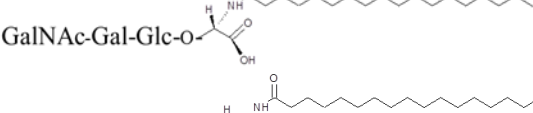
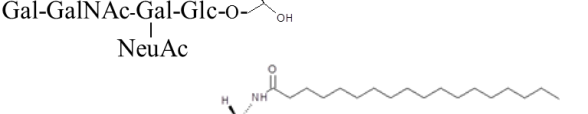
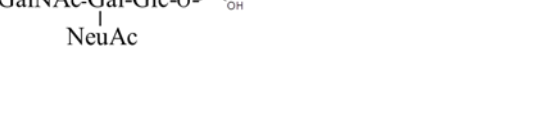
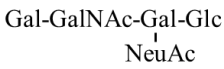
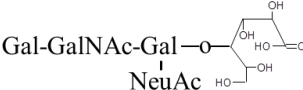
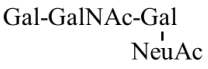
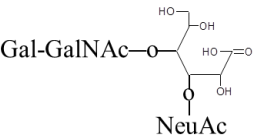


**Figura 4-1: Estrutura molecular das duas espécies moleculares de GM1 presentes no padrão de GM1.** (A) GM1(d18:1/C18:0) (Neu5Ac $\alpha$ 2-3(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer) e (B) GM1(d20:1/C18:0) com R<sup>1</sup> a corresponder à cadeia de hidratos de carbono (Neu5Ac $\alpha$ 2-3(Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4)Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1).

## Avaliação da oxidação não enzimática do GM1 utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massa de alta resolução

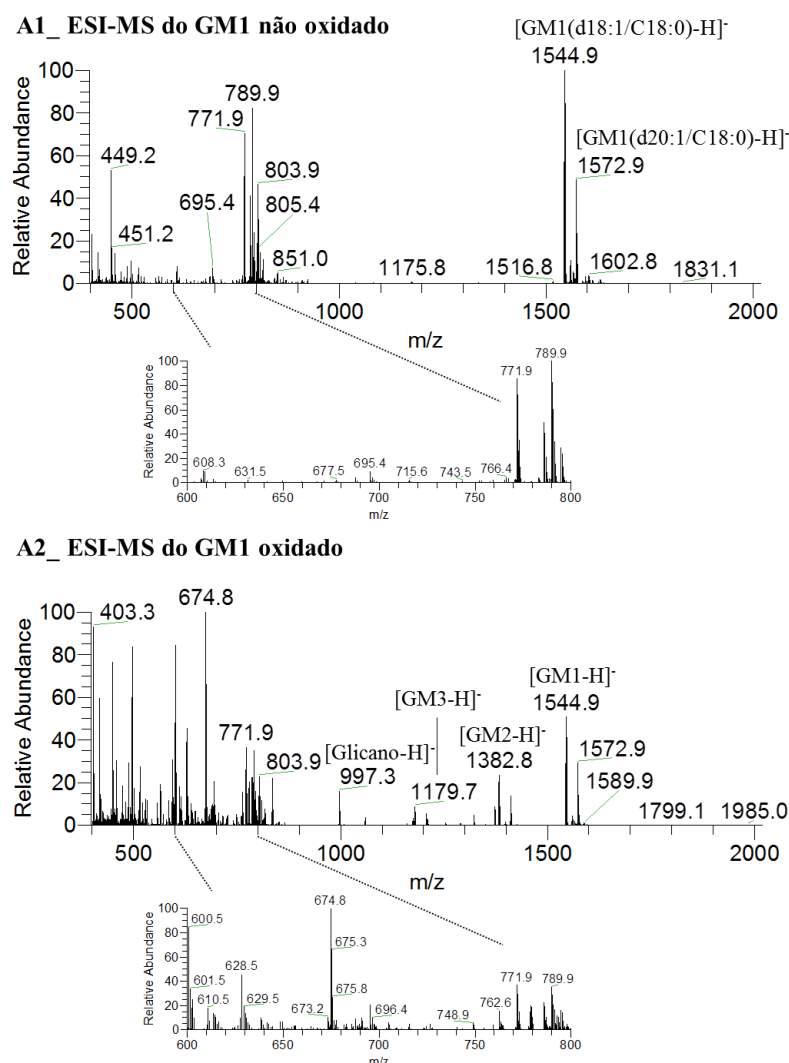
**Tabela 4-1: Resumo dos principais produtos de oxidação, formados após oxidação do GM1, e identificados nos espectros de ESI-MS.** Nesta tabela apresentamos os valores de  $m/z$  dos íons  $[M-H]^-$  e  $[M-2H]^{2-}$  observados, as estruturas moleculares propostas e suas identificações mais prováveis.

	Estruturas moleculares propostas	$[M-H]^-$	$[M-2H]^{2-}$
<b>Produtos de oxidação do GM1(d18:1/C18:0)</b>	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer NeuAc	1544.9	771.9
<b>Derivados oxigenados GM1</b>			
GM1 + O-2Da		1558.8	778.9
GM1 + O		1560.9	-
<b>Quebra oxidativa da cadeia do glicano e seus derivados oxidados</b>			
asialoGM1/(GM1-NeuAc <sub>res</sub> )	Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer	1253.8	-
GM2	GalNAc-Gal-Glc-Cer NeuAc	1382.8	690.9
GM2+O		1398.8	-
GM2+O-2Da		1396.8	697.9
asialoGM2/(GM2-NeuAc <sub>res</sub> )	GalNAc-Gal-Glc-Cer	1091.7	-
GM3	Gal-Glc-Cer NeuAc	1179.7	589.4
LacCer/(GM3-NeuAc <sub>res</sub> )	Gal-Glc-Cer	888.6	-
GlcCer+O-2Da		740.6	-
GlcCer	Glc-Cer	726.6	-
Cer	Cer	564.5	-
Cer+O-2Da		578.5	-
Cer+O		580.5	-
<b>Quebra oxidativa da cadeia de esfingosina do GM1</b>			

Quebra entre C3-C4		1350.6	674.8
Quebra entre C3-C4-Hex <sub>res</sub>		1188.6	593.8
Quebra entre C3-C4-NeuAc <sub>res</sub>		1059.5	-
Quebra entre C3-C4-Hex <sub>res</sub> - NeuAc <sub>res</sub>		897.5	
Quebra entre C2-C3		1322.6	
Quebra entre C2-C3-Hex <sub>res</sub>		1160.6	-
<b>Glicanos e glicanos oxidados</b>			
Glicano		997.3	-
Glicano-2Da		995.3	-
Glicano + O		1013.3	506.2
Glicano-Hex <sub>res</sub>		835.3	-
Glicano-Hex <sub>res</sub> -2Da		833.3	-
Glicano-Hex <sub>res</sub> +O		851.3	-

Após análise do espectro de ESI-MS do GM1 oxidado (GM1/Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi possível identificar iões que não tinham sido observados em experiências de controlo (ver figura 2 e tabela 1), alguns com valores mais elevados que o GM1 não modificado e outros com valores de *m/z* mais baixos quando comparados com o valor de *m/z* do gangliósido não oxidado. Neste espectro de ESI-MS, foi possível observar os mesmos produtos de oxidação para ambas as espécies moleculares, no entanto apenas descreveremos os derivados oxidados da espécie molecular de GM1 mais abundante, ou seja, o

GM1(d18:1/C18:0) como iões  $[M-H]^-$  e  $[M-2H]^{2-}$  observados com valor de  $m/z$  1544.9 e 771.9, respetivamente.



**Figura 4-2: Oxidação do GM1 induzida por radicais hidroxilo e monitorizada por ESI-MS.** Comparação do espectro de massa ESI do GM1 não oxidado (A1), e GM1 oxidado (A2) em que a oxidação foi induzida por radicais hidroxilo produzidos, em condições de reação de Fenton ( $H_2O_2/Fe^{2+}$ ).

Os produtos de oxidação com pesos moleculares mais elevados quando comparados com o GM1(d18:1/C18:0), foram detetados como iões  $[M-H]^-$ , de  $m/z$  1558.8 e  $m/z$  1560.9, e foram designados como derivados ceto (+14 Da) e hidroxil (+16 Da), respetivamente (tabela 1). Neste espectro foi também possível de observar o ião de carga dupla,  $[M-2H]^{2-}$ , de  $m/z$  778.9, do derivados ceto.

Por outro lado, também foram observados iões abundantes com valores mais baixos de  $m/z$  que o GM1 não modificado. Estes foram, essencialmente, atribuídos a produtos

formados por quebras oxidativas das ligações glicosídicas da correspondente cadeia de hidratos de carbono (glicano) do GM1. A quebra oxidativa do glicano, levou à formação do respetivo GM2 ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  1382.8), GM3 ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  1179.7), a asialoGM1 (GM1-NeuAc<sub>res</sub>) ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  1253.8), asialoGM2 (GM2-NeuAc<sub>res</sub>) ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  1091.7), LacCer ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  888.6) e GlcCer ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  726.6) (figura 2 e tabela 1). O GM2 e GM3 também foram identificados como iões duplamente carregados  $[M-2H]^{2-}$ . Foram ainda observados iões moleculares, com baixa abundância relativa, correspondentes aos derivados oxigenados de GM2, nomeadamente os derivados ceto e hidroxi, como iões  $[M-H]^-$  de  $m/z$  1396.8 e 1398.8 respetivamente, e aos derivados ceto da GlcCer de  $m/z$  740.6.

Nestas condições de oxidação não enzimática ocorreu ainda a quebra oxidativa da ligação entre a ceramida e o glicano que levou à libertação de glicanos livres ( $[glicano-H]^-$  de  $m/z$  997.3 e  $[glicano-Hex_{res}-H]^-$  de  $m/z$  835.3), e de ceramidas ( $[Cer-H]^-$  de  $m/z$  564.5). Os seus homólogos oxidados também foram detetados no espectro de MS, nomeadamente Glicano-2Da, Glicano+O, Glicano-Hex<sub>res</sub>-2Da, Glicano-Hex<sub>res</sub>+O, Cer+O-2Da e Cer+O (todos os iões descritos estão sumarizados na tabela 1). As quebras oxidativas reportadas aqui, quer da cadeia do glicano quer entre a Cer e o glicano, são similares às previamente observadas para os oligossacarídeos e mais recentemente para os glicosfingolípídeos (especificamente para a GalCer e para a LacCer) [13,28,112].

Além destes iões, resultantes das quebras de ligações glicosídicas, foram ainda identificados no espectro de ESI-MS do GM1 oxidado, novos iões atribuídos a produtos de oxidação formados por quebra oxidativa da cadeia de esfingosina do GM1 entre C3-C4, com formação de um grupo ácido (-COOH) terminal em C3 ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  1350.6 e  $[M-H]^{2-}$  de  $m/z$  674.8), e por quebra oxidativa entre C2-C3, com formação de um grupo metoxilo (-CH<sub>2</sub>OH) terminal em C2 ( $[M-H]^-$  de  $m/z$  1322.6). Esta quebra oxidativa da cadeia de esfingosina entre C3-C4 também foi observada para os derivados GM2, asialoGM1 e asialoGM2 e entre C2-C3 para o GM2 (tabela 1). A composição molecular proposta para todos estes produtos de oxidação foi confirmada pelas medidas de massa exatas obtidas por espectrometria de massa de alta resolução (LTQ orbitrap), como se pode observar na tabela 2.



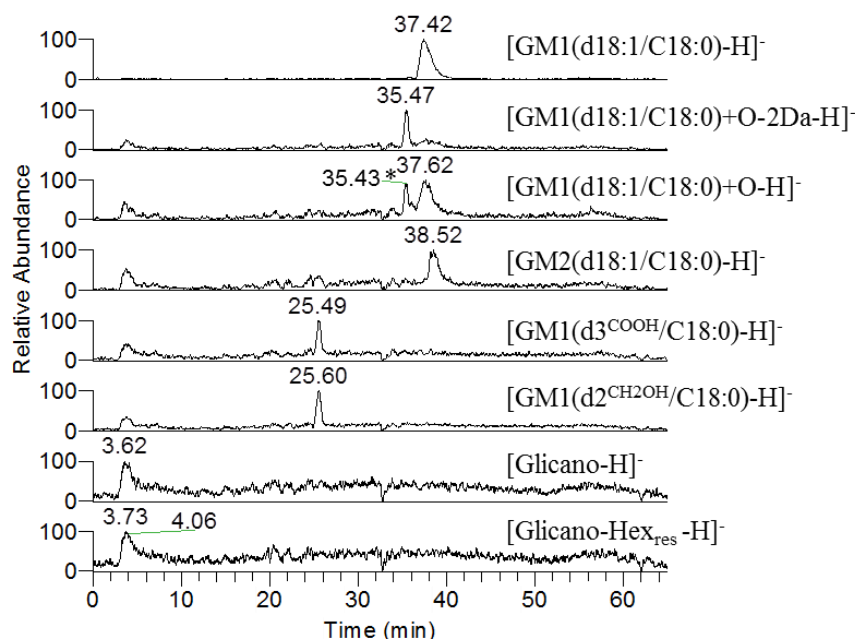
## Avaliação da oxidação não enzimática do GM1 utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massa de alta resolução

**Tabela 4-2: Medição das massas exactas dos novos iões detectados, por ESI-MS, após oxidação.** Todos os iões são designados com a sua fórmula prevista, massa observada, massa calculada e erro de massa medida.

Produtos de oxidação	Fórmula prevista	Massa observada (Da)	Massa calculada (Da)	Erro (mDa)	Erro (ppm)
<b><u>Produtos de oxidação do GM1(d18:1/C18:0)</u></b>					
[M-H] <sup>-</sup>					
GM1(d18:1/C18:0)+O	C <sub>73</sub> H <sub>130</sub> N <sub>3</sub> O <sub>32</sub>	1560.8620	1560.8643	-0.0022786	-1.5
GM1(d18:1/C18:0)+O-2Da	C <sub>73</sub> H <sub>128</sub> N <sub>3</sub> O <sub>32</sub>	1558.8464	1558.8486	-0.0021861	-1.4
GM1(d18:1/C18:0)	C <sub>73</sub> H <sub>130</sub> N <sub>3</sub> O <sub>31</sub>	1544.8694	1544.8694	2.2E-05	0.0
GM2(d18:1/C18:0)+O	C <sub>67</sub> H <sub>120</sub> N <sub>3</sub> O <sub>27</sub>	1398.8095	1398.8115	-0.0019793	-1.4
GM2(d18:1/C18:0)+O-2Da	C <sub>67</sub> H <sub>118</sub> N <sub>3</sub> O <sub>27</sub>	1396.7959	1396.7958	7.119E-05	0.1
GM2(d18:1/C18:0)	C <sub>67</sub> H <sub>120</sub> N <sub>3</sub> O <sub>26</sub>	1382.8149	1382.8166	-0.0017366	-1.3
asialoGM1(d18:1/C18:0)	C <sub>62</sub> H <sub>113</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>	1253.7729	1253.7740	-0.0010466	-0.8
GM3(d18:1/C18:0)	C <sub>59</sub> H <sub>107</sub> N <sub>2</sub> O <sub>21</sub>	1179.7360	1179.7372	-0.0012173	-1.0
asialoGM2(d18:1/C18:0)	C <sub>56</sub> H <sub>103</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub>	1091.7199	1091.7211	-0.0012587	-1.2
LacCer(d18:1/C18:0)	C <sub>48</sub> H <sub>90</sub> NO <sub>13</sub>	888.6432	888.6418	0.001434	1.6
GlcCer(d18:1/C18:0)+O-2Da	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>9</sub>	740.5686	740.5682	0.000418432	0.6
GlcCer(d18:1/C18:0)	C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub>	726.5893	726.5889	0.000390669	0.5
Cer(d18:1/C18:0)+O	C <sub>36</sub> H <sub>70</sub> NO <sub>4</sub>	580.5309	580.5310	-0.000133	-0.2
Cer(d18:1/C18:0)+O-2Da	C <sub>36</sub> H <sub>68</sub> NO <sub>4</sub>	578.5173	578.5154	0.001916943	3.3
Cer(d18:1/C18:0)	C <sub>36</sub> H <sub>70</sub> NO <sub>3</sub>	564.5379	564.5361	0.001835678	3.3
Quebra em C3-C4	C <sub>58</sub> H <sub>100</sub> N <sub>3</sub> O <sub>32</sub>	1350.6259	1350.6295	-0.00366309	-2.7
Quebra em C2-C3	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> N <sub>3</sub> O <sub>31</sub>	1322.6331	1322.6346	-0.00156887	-1.2
Quebra em C3-C4 -Hex <sub>res</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>90</sub> N <sub>3</sub> O <sub>27</sub>	1188.5745	1188.5767	-0.0021831	-1.8
Quebra em C3-C4 -Hex <sub>res</sub> - NeuAc <sub>res</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>73</sub> N <sub>2</sub> O <sub>19</sub>	897.4773	897.4813	-0.004002	-4.5
Quebra em C2-C3-Hex <sub>res</sub>	C <sub>51</sub> H <sub>90</sub> N <sub>3</sub> O <sub>26</sub>	1160.5810	1160.5818	-0.00084372	-0.7
Quebra em C3-C4 -NeuAc <sub>res</sub>	C <sub>47</sub> H <sub>83</sub> N <sub>2</sub> O <sub>24</sub>	1059.5334	1059.5341	-0.00067689	-0.6
Glicano + O	C <sub>37</sub> H <sub>61</sub> N <sub>2</sub> O <sub>30</sub>	1013.3287	1013.3315	-0.0028	-2.8
Glicano	C <sub>37</sub> H <sub>61</sub> N <sub>2</sub> O <sub>29</sub>	997.3355	997.3365	-0.0009544	-1.0
Glicano-2Da	C <sub>37</sub> H <sub>59</sub> N <sub>2</sub> O <sub>29</sub>	995.3167	995.3209	-0.004197	-4.2
Glicano-Hex <sub>res</sub> +O	C <sub>31</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>25</sub>	851.2748	851.2786	-0.0038	-4.5
Glicano-Hex <sub>res</sub>	C <sub>31</sub> H <sub>51</sub> N <sub>2</sub> O <sub>24</sub>	835.2837	835.2837	-3.4835E-05	0.0
Glicano-Hex <sub>res</sub> -2Da	C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>24</sub>	833.2653	833.2681	-0.002774	-3.3
[M+Na-2H] <sup>-</sup>					
Quebra em C3-C4	C <sub>58</sub> H <sub>99</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>32</sub>	1372.6099	1372.6115	-0.00156582	-1.1
Quebra em C3-C4 -Hex <sub>res</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>89</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>27</sub>	1210.5578	1210.5587	-0.00088106	-0.7
[M+Na-3H] <sup>2-</sup>					
Quebra em C3-C4	C <sub>58</sub> H <sub>98</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>32</sub>	685.8030	685.8021	0.000845199	1.2
[M-2H] <sup>2-</sup>					

Quebra C3-C4	$C_{58}H_{99}N_3O_{32}$	674.8119	674.8111	0.000736356	1.1
Quebra em C3-C4 -Hex <sub>res</sub>	$C_{52}H_{89}N_3O_{27}$	593.7826	593.7847	-0.002121	-3.6
GM1(d18:1/C18:0)+O-2Da	$C_{73}H_{127}N_3O_{32}$	778.9204	778.9207	-0.00026325	-0.3
GM2(d18:1/C18:0)+O-2Da	$C_{67}H_{117}N_3O_{27}$	697.8914	697.8943	-0.0028715	-4.1
GM1(d18:1/C18:0)	$C_{73}H_{129}N_3O_{31}$	771.9311	771.9311	4.9E-05	0.1
GM2(d18:1/C18:0)	$C_{67}H_{119}N_3O_{26}$	690.9053	690.9047	0.000644814	0.9
GM3(d18:1/C18:0)	$C_{59}H_{106}N_2O_{21}$	589.3667	589.3650	0.001703669	2.9
glicano+O	$C_{37}H_{60}N_2O_{30}$	506.1600	506.1621	-0.002093	-4.1
[M-Cl] <sup>-</sup>					
AsialoGM1(d18:1/C18:0)+Cl <sup>35</sup> -	$C_{62}H_{114}Cl^{35}N_2O_{23}$	1289.7485	1289.7506	-0.00215402	-1.7
Cer(d18:1/C18:0)+O+Cl <sup>35</sup>	$C_{36}H_{71}Cl^{35}NO_4$	616.5092	616.5077	0.001502503	2.4
Cer(d18:1/C18:0)+Cl <sup>35</sup>	$C_{36}H_{71}Cl^{35}NO_3$	600.5145	600.5128	0.001719057	2.9
Cer(d18:1/C18:0)+O-2Da+Cl <sup>35</sup>	$C_{36}H_{69}Cl^{35}NO_4$	614.4934	614.4921	0.001330453	2.2
[M-Cl-H] <sup>2-</sup>					
GM1(d18:1/C18:0)+Cl <sup>35</sup> -H	$C_{73}H_{130}Cl^{35}N_3O_{31}$	789.9198	789.9194	0.000368843	0.5
GM2(d18:1/C18:0)+Cl <sup>35</sup> -H	$C_{67}H_{120}Cl^{35}N_3O_{26}$	708.8935	708.8930	0.000506435	0.7

Para avaliar a possível presença de produtos de oxidação isoméricos, a amostra de GM1 oxidada foi analisada por HPLC-MS utilizando uma coluna de C5 em fase reversa, como descrito na secção experimental (capítulo 2). Os cromatogramas reconstruídos dos iões (RICs) dos seguintes produtos [GM1(d18:1/C18:0)-H]<sup>-</sup>, [GM1(d18:1/C18:0)+O-2Da-H]<sup>-</sup>, [GM1(d18:1/C18:0)+O-H]<sup>-</sup>, [GM2(d18:1/C18:0)-H]<sup>-</sup>, [GM1(d3<sup>COOH</sup>/C18:0)-H]<sup>-</sup>, [GM1(d2<sup>CH2OH</sup>/C18:0)-H]<sup>-</sup>, [Glicano-H]<sup>-</sup>, [Glicano-Hex<sub>res</sub>-H]<sup>-</sup> mostram que estes eluem em apenas um pico cromatográfico, o que sugere a ausência de espécies isoméricas (figura 3). Para caracterizar os detalhes estruturais e reconfirmar a identidade dos produtos de oxidação acima mencionados recorreu-se à espectrometria de massa tandem de ionização por electrospray (ESI-MS/MS).



**Figura 4-3: Análise em LC-MS dos produtos de oxidação do GM1.** Cromatogramas reconstruídos dos iões de  $[GM1(d18/C18:0)-H]^-$  de  $m/z$  1544.9 designados como o GM1 não modificado, de  $[GM1(d18/C18:0)+O-2Da-H]^-$  de  $m/z$  1558.9 designados como os derivados ceto do GM1, de  $[GM1(d18/C18:0)+O-H]^-$  de  $m/z$  1560.9 designados como os derivados hidroxí do GM1, de  $[GM2(d18/C18:0)-H]^-$  de  $m/z$  1382.8 designados como o GM2 não modificado, de  $[GM1(d3^{COOH}/C18:0)-H]^-$  (de  $m/z$  1350.6) resultantes da quebra oxidativa da cadeia de esfingosina entre C3-C4 com formação de um ácido carboxílico em C3, de  $[GM1(d2^{CH_2OH}/C18:0)-H]^-$  (de  $m/z$  1322.6) resultantes da quebra oxidativa da cadeia de esfingosina entre C2-C3 com formação de um grupo hidroxilo em C2. Por último, os RICs dos glicanos:  $[Glicano-H]^-$  de  $m/z$  997.3 designados como o glicano não modificado, e  $[Glicano-Hex_{res}-H]^-$  designados como o glicano não modificado menos um resíduo de hexose. \*contribuição dos iões correspondentes aos derivados ceto do GM1. V0, volume morto.

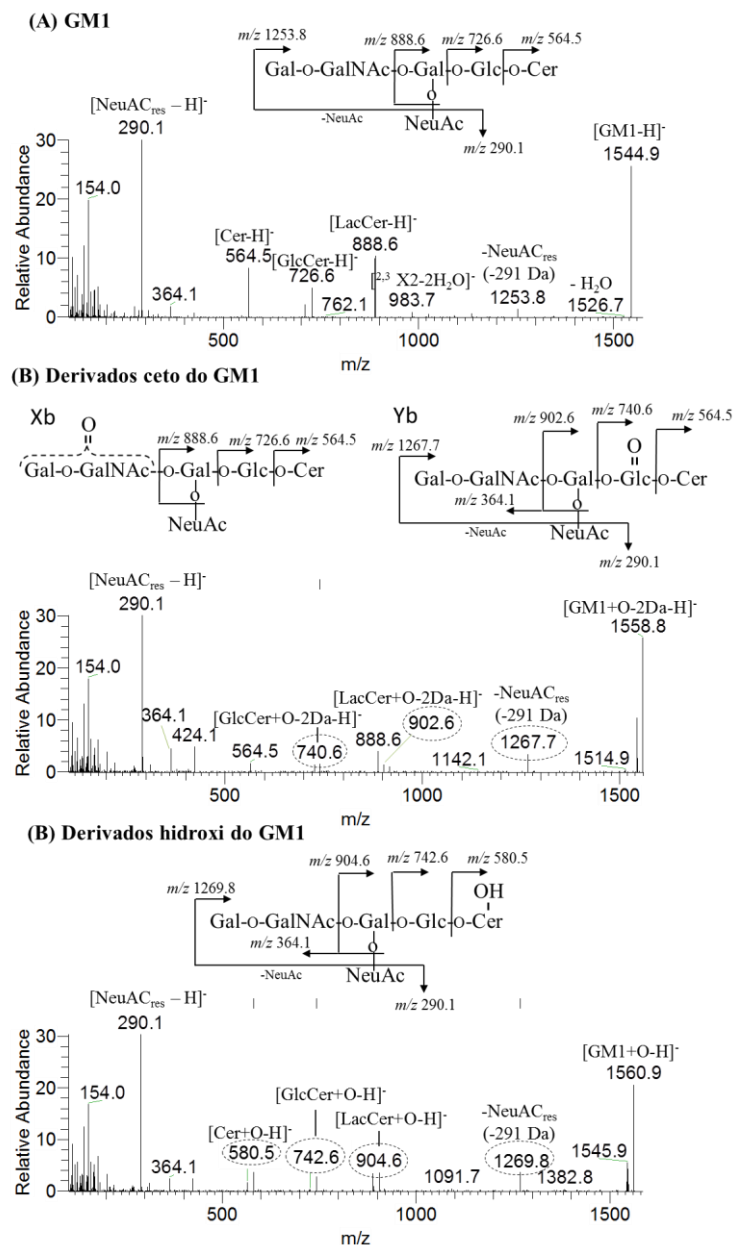
#### 4.1.2. Espectrometria de massa Tandem na análise dos produtos de oxidação observados em ESI-MS do GM1 sob oxidação radicalar

As análises por ESI-MS/MS, descritas nesta secção, permitiram confirmar as modificações estruturais, anteriormente sugeridas, após oxidação radicalar de GM1. As vias de fragmentação observadas nos espectros de MS/MS do ião  $[M-H]^-$  do GM1 não modificado (figura 4 (A)), de  $m/z$  1544.7, envolveram a perda típica de  $NeuAc_{res}$  (-291Da) ( $[asialoGM1-H]^-$  de  $m/z$  1253.8) e perdas sucessivas de hidratos de carbono, por quebras de ligações glicosídicas, produzindo os seguintes iões diagnóstico:  $[LacCer-H]^-$  ( $m/z$  888.6),  $[GlcCer-H]^-$  ( $m/z$  726.6), e  $[Cer-H]^-$  ( $m/z$  564.5) como previamente reportado [111]. Por outro lado, no espectro de MS/MS dos iões duplamente desprotonados  $[M-2H]^{2-}$  do GM1 não modificado, foi possível observar outros iões produto informativos. Neste espectro de

MS/MS foi possível observar o íon produto designado como a cadeia de ácido gordo inalterada (de  $m/z$  308.3, que surge da perda combinada do glicano e da quebra da ligação entre C2-C3 da cadeia de esfingosina [113]) e os íões que correspondem a fragmentos da cadeia de hidratos de carbono não modificada. Alguns destes últimos íões foram designados por:  $[\text{HexGalNAc}_{\text{res}}\text{-H}]^-$  de  $m/z$  364.1 (um dissacarídeo),  $[\text{NeuAc}_{\text{res}}\text{-H}]^-$  de  $m/z$  290.1,  $[\text{GalNAc}_{\text{res}}\text{-H}]^-$  de  $m/z$  202.1,  $[\text{Hex}_{\text{res}}\text{-H}]^-$  de  $m/z$  179.1,  $[\text{Glicano-H}]^-$  de  $m/z$  997.3 (que surge da perda neutra de Cer) e  $[\text{Glicano-Hex}_{\text{res}}\text{-H}]^-$  de  $m/z$  835.3 (que surge da perda combinada de Cer e uma hexose), como já descrito [88]. Ainda, neste espectro de MS/MS também foi possível observar íões produto resultantes da perda combinada de Cer e fragmentações características dos hidratos de carbono (com abertura do anel de um açúcar das extremidades), nomeadamente os íões duplamente carregados designados como  $[\text{Glicano-120Da-2H}]^{2-}$  de  $m/z$  438.1 [88] e os íões de carga unitária designados como  $[\text{Glicano- NeuAc}_{\text{res}}\text{-120Da-H}]^-$  de  $m/z$  586.2 estes também resultam da perda do ácido neuramínico [114]. Desvios nos valores de  $m/z$  destes íões foram usados para identificar as modificações oxidativas e as características estruturais dos produtos formados durante a oxidação radicalar do GM1.

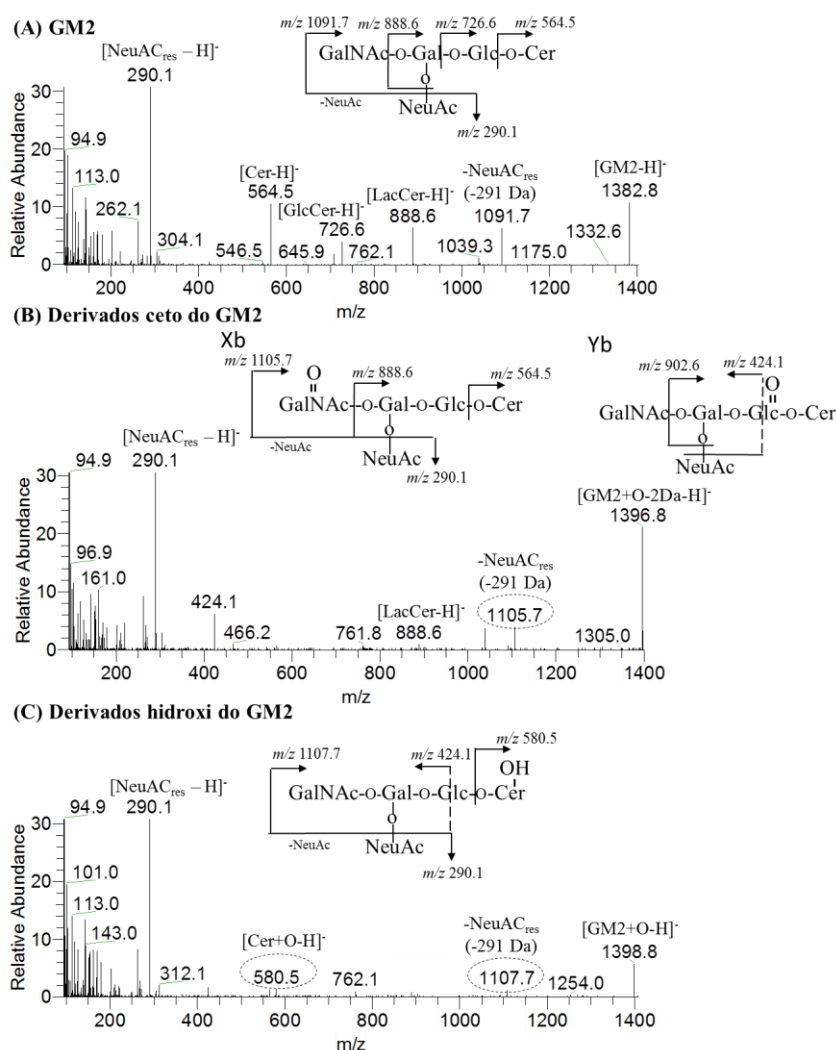
As vias de fragmentação observadas nos espectros de MS/MS dos derivados oxigenados do GM1 (derivado ceto e hidroxí-GM1) foram similares às vias de fragmentação do GM1 não modificado  $[\text{M-H}]^-$ , detalhadas anteriormente. Nos espectros de MS/MS, dos íões  $[\text{M-H}]^-$  dos derivados oxigenados do GM1, isto é, dos derivados ceto (GM1+O-2Da) e hidroxí (GM1+O), foi possível observar os íões produto correspondentes à perda neutra de  $\text{NeuAc}_{\text{res}}$  (-290 Da), aos íões produto correspondentes à LacCer oxidada (designada como  $[\text{LacCer+O-2Da-H}]^-$  ou  $[\text{LacCer+O-H}]^-$ ) e GlcCer oxidada (designada como  $[\text{GlcCer+O-2Da-H}]^-$  ou  $[\text{GlcCer+O-H}]^-$ ), respetivamente. A presença da Cer oxidada,  $[\text{Cer+O-H}]^-$  de  $m/z$  580.5 indica que o grupo hidroxilo, para o derivado hidroxí do GM1, está localizado na Cer (figura 4 (C)). No entanto, para o derivado ceto do GM1, a ausência da Cer oxidada e a presença do íon  $[\text{Cer-H}]^-$  sugere que o grupo ceto está localizado no glicano (figura 4 (B)). No espectro de MS/MS do derivado ceto do GM1 o íon produto  $[\text{LacCer+O-2Da-H}]^-$  indica oxidação nos resíduos de glucose (I) ou galactose (II). Por sua vez, o íon  $[\text{GlcCer+O-2Da-H}]^-$  sugere a oxidação de Glc (I) (figura 4 (B\_Yb)). A presença do íon  $[\text{LacCer -H}]^-$  sugere-nos ainda a existência de isómeros posicionais com o grupo ceto no outro resíduo de Gal (IV) ou em GalNAc (III) (figura 4 (B\_Xb)). O grupo

ceto localizado num destes açúcares foi reconfirmado pela presença do ião de  $m/z$  378.1 ( $[\text{HexGalNAc}_{\text{res}}+\text{O}-2\text{Da}-\text{H}]^-$ ) no espectro de MS/MS do  $[\text{GM1}+\text{O}-2\text{Da}-2\text{H}]^{2-}$ . Ainda, a análise do espectro de MS/MS do  $[\text{GM1}+\text{O}-2\text{Da}-2\text{H}]^{2-}$  permitiu-nos confirmar a localização do grupo ceto em GalNAc<sub>res</sub> (III), inferido pela presença do ião de  $m/z$  216.1 identificado como  $[\text{GalNAc}_{\text{res}}+\text{O}-2\text{Da}-\text{H}]^-$ , e em Gal(IV) pela observação do ião de  $m/z$  1382.8, formado pela perda da Gal (IV) oxidada ( $-\text{[162+14]}=176$ ), e do ião de  $m/z$  193.0  $[\text{Hex}+\text{O}-2\text{Da}-\text{H}]^-$  ( $179.0+14$ ). A oxidação de Glc(I), Gal(IV) e GalNAc (III) pode, muito provavelmente, ter ocorrido em C6, com formação de resíduos de ácido urónico, à semelhança do que foi observado durante oxidação radicalar de oligossacarídeos [13]. Não foi possível separar estes isómeros posicionais por HPLC, assim ambos os compostos presentes na amostra, eluíram num único pico (figura 3). Para os derivados ceto e hidroxido GM2 foram observadas vias de fragmentação idênticas (tabela 3, figura 5).



**Figura 4-4:** Os espectros de MS/MS do GM1 não modificado e dos seus derivados oxigenados. (A) Espectro de MS/MS do  $[M-H]^-$  GM1 não modificado de  $m/z$  1544.9 e suas vias de fragmentação. (B). Espectro de MS/MS do  $[M-H]^-$  do derivado ceto do GM1 com  $m/z$  1558.8 e seus três possíveis isômeros posicionais propostos na cadeia de hidratos de carbono: especificamente com o grupo ceto nos resíduos de Gal (IV) e/ou GalNAc (III) (B-Xb) e no resíduo de Glc (I) (B-Yb). (C) Espectro de MS/MS do  $[M-H]^-$  do derivado hidroxi do GM1, de  $m/z$  1560.9 e suas vias de fragmentação com a proposta do grupo hidroxilo localizado na ceramida (C).

## Avaliação da oxidação não enzimática do GM1 utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massa de alta resolução



**Figura 4-5: Os espectros de MS/MS do GM2 não modificado e dos seus derivados oxigenados.** (A) Espectro de MS/MS do [M-H]<sup>-</sup> GM2 não modificado de  $m/z$  1382.8 e suas vias de fragmentação. (B) Espectro de MS/MS do [M-H]<sup>-</sup> do derivado ceto do GM2 com  $m/z$  1396.8 e seus dois possíveis isômeros posicionais propostos na cadeia de hidratos de carbono: especificamente com o grupo ceto nos resíduos de GalNAc (III) (B-Xb) e no resíduo de Glc (I) (B-Yb). (C) Espectro de MS/MS do [M-H]<sup>-</sup> do derivado hidroxí do GM2, de  $m/z$  1398.8 e suas vias de fragmentação com a proposta do grupo hidroxilo localizado na ceramida (C).

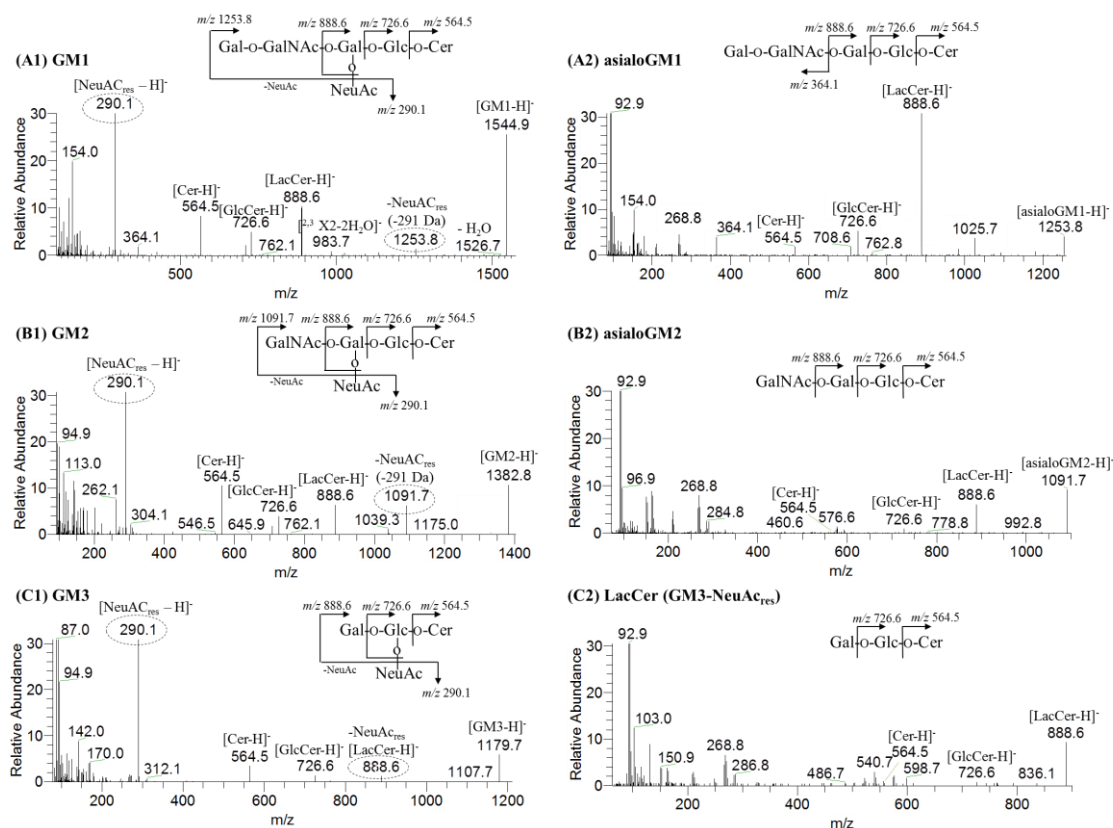
**Tabela 4-3: Principais íões produtos observados nos espectros de ESI-MS/MS de íões [M-H]<sup>-</sup> dos derivados oxigenados GM1 e GM2, com a indicação dos valores de  $m/z$  e as vias de fragmentação mais prováveis.**

	GM1		GM2	
	GM1+O - 2Da (+14)	GM1+O (+16)	GM2 +O - 2Da (+14)	GM2 +O (+16)
[M-H] <sup>-</sup>	1558.8	1560.9	1396.8	1398.8
-NeuAc <sub>res</sub> (-291 Da)	1267.7	1269.8	1105.7	1107.7
LacCer oxidada	902.6	904.6	902.6	-
LacCer	888.6	-	888.6	-
GlcCer oxidada	740.6	742.6	-	-
GlcCer	726.6	-	-	-
Cer oxidada	-	580.5	-	580.5
Cer	564.5	-	564.5	-
Glicano <sub>res</sub> -hex <sub>res</sub> -60Da-NeuAc <sub>res</sub>	-	466.2	-	-
Glicano-hex <sub>res</sub> -120Da-NeuAc <sub>res</sub>	424.1	424.1	424.1	424.1
NeuAc <sub>res</sub>	290.1	290.1	290.1	290.1
HexGalNAc <sub>res</sub>	364.1	364.1	-	364.1
GalNAc	-	-	220.1	220.1
GalNAc <sub>res</sub>	202.1	202.1	202.1	202.1
Hex	179.1	179.1	179.1	179.1
Hex <sub>res</sub>	161.0	161.0	161.0	161.0

A formação de novos gangliósidos: GM2, GM3, asialoGM1, asialoGM2, do globósido LacCer (GM3-NeuAc<sub>res</sub>) e do cerebrósido GlcCer, surgem da despolimerização oxidativa do GM1, sob condições não enzimáticas. A presença destes novos gangliósidos foi confirmada por espectrometria de massa tandem (figura 6 e tabela 4), que mostraram os íões produto característicos das vias de fragmentação previamente reportadas para estes gangliósidos [111,114]. Além disso, em todos os espectros de MS/MS (asialoGM1, GM2, asialoGM2, GM3, LacCer e GlcCer) foi possível observar a ceramida não modificada como íão [M-H]<sup>-</sup> com  $m/z$  564.5, confirmando a presença da ceramida (d18:1/C18:0). Adicionalmente, nos espectros de MS/MS do GM2 e do GM3 também foi possível observar dois íões produto abundantes por perda neutra de NeuAc<sub>res</sub> (-291Da) e o íão produto [NeuAc<sub>res</sub>-H]<sup>-</sup> com  $m/z$  290.1, que confirma a presença do ácido siálico. Esta fragmentação não ocorre nos MS/MS dos asialogangliósidos, LacCer e GlcCer, reconfirmando a ausência do ácido siálico (tabela 1).



## Avaliação da oxidação não enzimática do GM1 utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massa de alta resolução



**Figura 4-6:** Os espectros de MS/MS dos produtos formados devido à quebra oxidativa da cadeia de hidratos de carbono do GM1. Espectros de MS/MS do GM1 (A1), asialoGM1 (GM1- NeuAc<sub>res</sub>) (A2), GM2 (B1) asialoGM2 (GM2- NeuAc<sub>res</sub>) (B2), GM3 (C1) e LacCer (GM3-NeuAc<sub>res</sub>) (C2).

**Tabela 4-4:** Principais iões produtos observados nos espectros de ESI-MS/MS de iões [M-H]<sup>-</sup> do GM2, GM3, asialoGM1, asialoGM2, LacCer e GlcCer, com a indicação dos valores de *m/z* e as vias de fragmentação mais prováveis.

	GM2	GM3	asialoGM1	asialoGM2	LacCer	GlcCer
[M-H] <sup>-</sup>	1382.8	1179.7	1253.8	1091.7	888.6	726.6
-NeuAc <sub>res</sub> (-291 Da)	1091.7	-	-	-	-	-
LacCer	888.6	888.6	888.6	888.6	-	-
GlcCer	726.6	726.6	726.6	726.6	726.6	-
GlcCer-H <sub>2</sub> O	708.6	-	708.6	-	-	-
Cer	564.5	564.5	564.5	564.5	564.5	564.5
Cer- H <sub>2</sub> O	546.5	-	-	-	-	-
Glicano-hex <sub>res</sub> -120Da-NeuAc <sub>res</sub>	424.1	-	-	-	-	-
NeuAc <sub>res</sub>	290.1	290.1	-	-	-	-
HexGalNAc <sub>res</sub>	364.1	-	364.1	-	-	-
GalNAc	220.1	-	-	-	-	-
GalNAc <sub>res</sub>	202.1	-	-	-	-	-
Hex	179.1	179.1	179.1	179.1	179.1	179.1
Hex <sub>res</sub>	161.0	161.0	161.0	161.0	161.0	161.0

A oxidação do GM1 sob condições de Fenton, como previamente referido, também levou à libertação de ceramidas e glicanos. No espectro de ESI-MS/MS da ceramida

desprotonada,  $[M-H]^-$  identificámos os iões de  $m/z$  324.3, 308.3, 282.2, 265.3, 263.2 e 237.2, de acordo com a literatura [113,115]. O ião diagnóstico de  $m/z$  308.3 (designado como a cadeia de ácido gordo não modificada), confirmou a presença do ácido gordo C18:0 e o ião de  $m/z$  237.2 confirmou a presença da cadeia de esfingosina d18:0. Assim, o MS/MS da ceramida permitiu-nos confirmar a anterior proposta da libertação de ceramidas durante uma oxidação não enzimática do GM1, em concordância com o observado durante a oxidação de outros GSLs [10,112,116].

Os espectros de MS/MS de glicanos,  $m/z$  997.3 (glicano) e  $m/z$  835.3 (glicano-Hex<sub>res</sub>) revelaram iões típicos que surgiram da quebra de ligações glicosídicas (iões correspondentes a fragmentos da cadeia de hidratos de carbono não modificada de  $m/z$  364.1 e 290.1) e como resultado da combinada quebra de ligações glicosídicas e fragmentações características dos hidratos de carbono (com perdas essencialmente de 120Da), e não foram observados iões provenientes da ceramida intacta,  $[Cer-H]^-$ .

A análise de MS/MS dos glicanos oxidados como iões de carga unitária (designados como  $[glicano-Hex_{res}+O-H]^-$  e  $[glicano+O-H]^-$ ) permitiu-nos propor a formação de um novo grupo funcional (-COOH) e a sua localização, mais provável, na cadeia de hidratos de carbono. O abundante ião produto correspondente à perda neutra de NeuAc<sub>res</sub> (-291) e o ião produto correspondente à perda neutra de CO<sub>2</sub> (-44 Da), observado nestes espectros de MS/MS permitiu-nos confirmar a formação de um novo grupo ácido carboxílico (-COOH), ou seja, a formação de ácidos urónicos. Estes glicanos oxidados podem ser formados depois da libertação do respetivo glicano e a oxidação, provavelmente, ocorre em C1, no carbono anomérico do terminal redutor do açúcar, com formação de ácidos urónicos, como previamente sugerido para oligossacarídeos sob oxidação radicalar [13].

Os espectros de massa tandem dos iões correspondentes aos produtos de oxidação formados pela quebra oxidativa da cadeia de esfingosina entre C3-C4 do GM1, e do GM2 com formação do grupo terminal -COOH e C2-C3 do GM1, e do GM2 com formação do grupo terminal -CH<sub>2</sub>OH foram analisados e também permitiram-nos confirmar as respetivas estruturas propostas (tabela 1 e tabela 5).

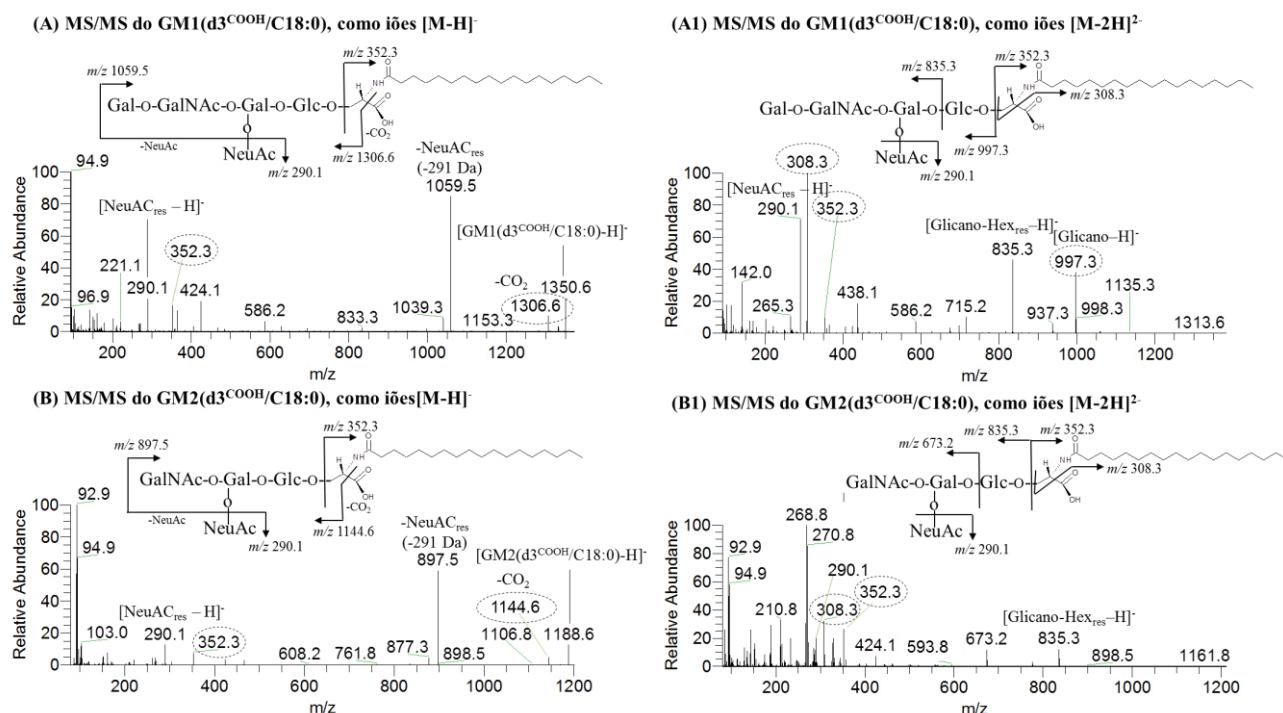
Nos espectros de MS/MS de  $[GM1(d3^{COOH}/C18:0)-H]^-$  e  $[GM2(d3^{COOH}/C18:0)-H]^-$ , originados pela quebra da ligação C3-C4 do GM1 e GM2, respetivamente, foi possível observar a perda neutra de CO<sub>2</sub> (-44 Da), que confirmou a presença de um grupo ácido

## Avaliação da oxidação não enzimática do GM1 utilizando uma abordagem baseada em espectrometria de massa de alta resolução

carboxílico. A perda neutra de 291Da, observado em ambos os espectros de MS/MS e a ausência dos típicos íons produto Cer, GlucCer e LacCer, assim como, a presença dos íons fragmento correspondentes a açúcares não modificados (como descrito em cima), reforçam a existência da ceramida modificada (figura 7 (A) e (B)). Adicionalmente, o novo íon produto chave de  $m/z$  352.3 formado pela perda do glicano não modificado (-998 Da ou 836 Da proveniente do derivado GM1 oxidado ou GM2, respetivamente), reconfirmou a quebra da ligação C3-C4 da cadeia de esfingosina (figura 7 (A) e (B)). Adicionalmente, os espectros de MS/MS do  $[M-2H]^{2-}$  permitiram confirmar a presença do glicano, com a presença do íon produto de  $m/z$  997.3 (para o derivado oxidado de GM1) e 835.3 (para o derivado oxidado de GM2), e o íon de  $m/z$  308.3 corrobora que o ácido gordo não foi oxidado (figura 7 (A1) e (B1)). O espectro de MS/MS do íon molecular que surgiu da quebra C3-C4 do asialoGM1, observado com  $m/z$  1059.5, não forneceu informação adicional e partilha o mesmo íon diagnóstico de valor de  $m/z$  352.3 (tabela 5) permitindo-nos confirmar a estrutura proposta (tabela 1).

**Tabela 4-5: Principais íons produtos observados nos espectros de ESI-MS/MS de íons  $[M-H]^-$  dos íons moleculares que surgiram da quebra da ligação da cadeia de esfingosina entre C3-C4 do GM1, GM2 e asialoGM1 com formação de um grupo  $-COOH$  terminal, com a indicação dos valores de  $m/z$  e as vias de fragmentação mais prováveis.**

	GM1 (d3 <sup>COOH</sup> /C18:0)	GM2 (d3 <sup>COOH</sup> /C18:0)	asialoGM1 (d3 <sup>COOH</sup> /C18:0)
$[M-H]^-$	1350.6	1188.6	1059.5
-H <sub>2</sub> O	1332.6	1170.6	-
-CO <sub>2</sub>	1306.6	1144.6	-
-NeuAc <sub>res</sub> (-291 Da)	1059.5	897.5	-
LacCer(d3 <sup>COOH</sup> /C18:0)	694.4	694.4	-
Glicano <sub>res</sub> -60Da-NeuAc <sub>res</sub>	628.2	-	628.2
Glicano-120Da-NeuAc <sub>res</sub>	586.2	-	586.2
Glicano <sub>res</sub> -hex <sub>res</sub> -60Da-NeuAc <sub>res</sub>	466.2	466.2	466.2
Glicano-hex <sub>res</sub> -120Da-NeuAc <sub>res</sub>	424.1	424.1	424.1
Glicano <sub>res</sub> -hex <sub>res</sub> -120Da-NeuAc <sub>res</sub>	406.1	-	406.1
Cer(d3 <sup>COOH</sup> /C18:0)	352.3	352.3	352.3
NeuAc <sub>res</sub>	290.1	290.1	-
HexGalNAc <sub>res</sub>	364.1	-	364.1
Cadeia de ácido gordo não modificada	-	-	308.3
GalNAc	-	220.1	-
GalNAc <sub>res</sub>	202.1	202.1	202.1
Hex	179.1	-	179.1
Hex <sub>res</sub>	161.0	161.0	161.0

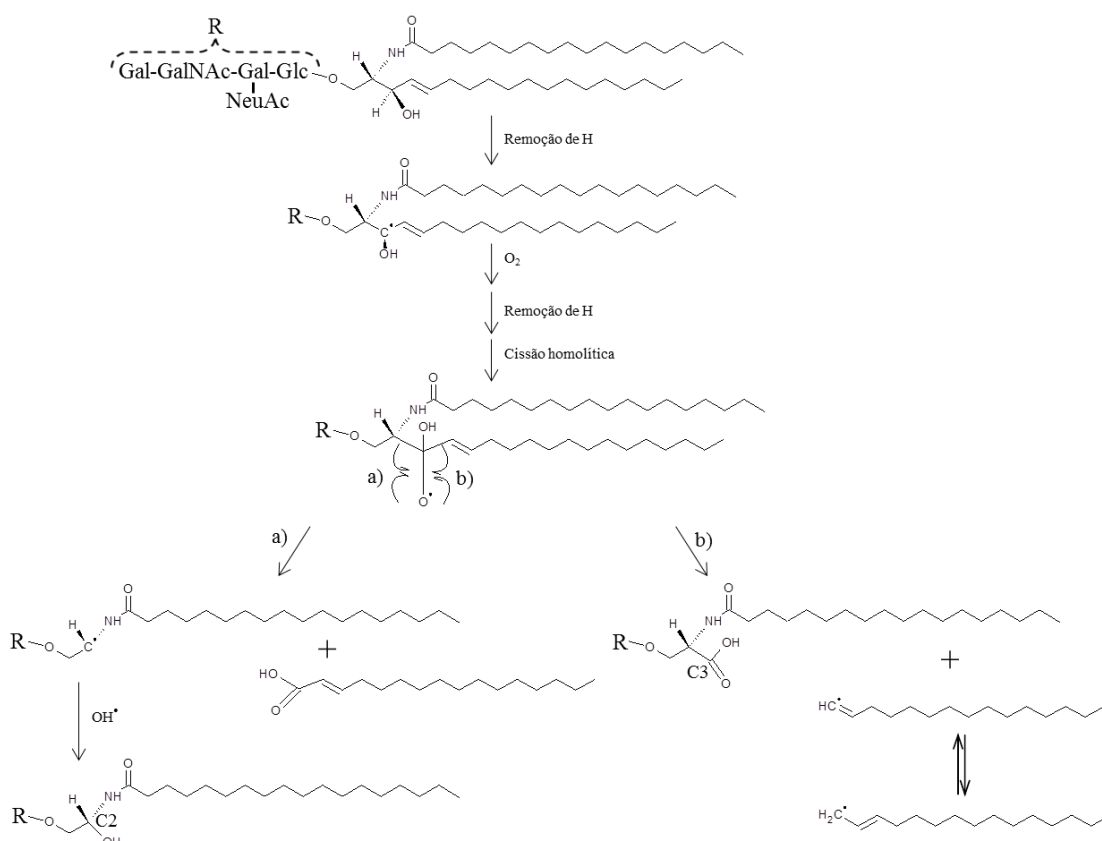


**Figura 4-7:** Os espectros de MS/MS dos produtos formados devido à quebra oxidativa entre C3-C4 da cadeia de esfingosina do GM1 e GM2 com grupo terminal -COOH. Os espectros de MS/MS dos derivados GM1 designados como iões de carga unitária [GM1(d3<sup>COOH</sup>/C18:0)-H]<sup>-</sup> (A) e iões de carga dupla [GM1(d3<sup>COOH</sup>/C18:0)-2H]<sup>2-</sup> (A1). Os espectros de MS/MS dos derivados de GM2 designados como iões de carga unitária [GM2(d3<sup>COOH</sup>/C18:0)-H]<sup>-</sup> (B) e iões de carga dupla [GM2(d3<sup>COOH</sup>/C18:0)-2H]<sup>2-</sup> (B1).

## 4.2. Discussão

Com este estudo foi possível observar que os gangliósidos são susceptíveis de sofrer modificações em condições oxidativas e que a sua oxidação não enzimática leva à formação de uma grande diversidade de produtos de oxidação, com diferentes características estruturais. A oxidação radicalar não enzimática do GM1 levou à formação de derivados oxigenados do GM1 (derivados ceto e hidroxil) e à formação de novos gangliósidos, globósidos, cerebrósidos, ceramidas e produtos de oxidação derivados da quebra oxidativa da esfingosina.

A oxidação da esfingosina parece ocorrer depois da remoção de um hidrogénio de C3, com subsequente fragmentação entre C2-C3 (com formação de um grupo hidroxilo em C2) e C3-C4 (com formação de um grupo terminal ácido carboxílico em C3) da cadeia de esfingosina (esquema 1).



**Esquema 4-1: Mecanismo radicalar proposto para a formação dos íões, observados no espectro de ESI-MS, que surgiram da quebra da cadeia de esfingosina entre C2-C3 (a) e entre C3-C4 (b).**

A oxidação *in vitro* do GM1 levou ainda à formação de glicanos, glicanos oxidados (designados como glicanos-2Da) e novos glicolípidos. Os novos glicolípidos identificados foram o GM2, e GM2 oxigenado (como derivados ceto e hidroxil), GM3, asialoGM1, asialoGM2, LacCer, GlcCer e derivados ceto de GlcCer, assim como ceramidas e derivados ceto e hidroxil de Cer. A formação destes produtos pode ocorrer em consequência da formação de radicais em C1 e C2 nas hexoses, como reportado para a oxidação de GalCer por radiação [10]. Os radicais centrados em C1 dos açúcares podem sofrer clivagem  $\beta$  originando glicanos oxidados de valor de  $m/z$  995.3 e 833.3. Estes radicais podem ainda ser hidrolisados, originando todas as outras espécies referidas anteriormente. Adicionalmente, a quebra da ligação glicosídica de GM1 contendo radicais centrados em C2 pode originar a formação de espécies referidas anteriormente, com exceção dos glicanos [10,116]. Assim, similarmente ao sugerido, nós propomos a quebra das ligações glicosídicas através dos radicais, centrados em C1 e C2 nas hexoses do GM1.

Por sua vez, a formação dos outros glicanos oxidados (de valor de  $m/z$  851.3 e 1013.3) observados com a abertura de uma das hexoses, iões muito pouco abundantes, ocorreu provavelmente depois da libertação prévia dos glicanos.

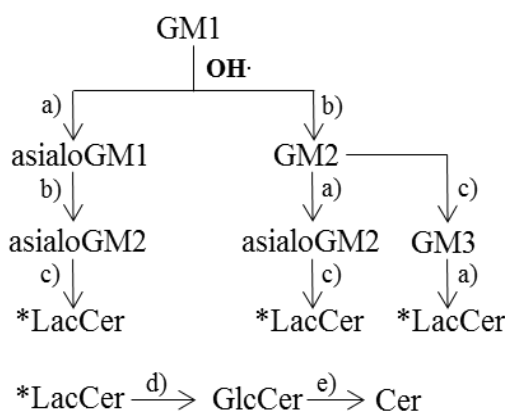
Durante o período normal de desenvolvimento cerebral, o conteúdo dos gangliósidos é alterado, variando entre gangliósidos simples, essencialmente GM3 e GD3, os gangliósidos predominantes no desenvolvimento embrionário, para gangliósidos mais complexos GM1a, GD1a, GD1b e GT1b, predominantes nas fases tardias de desenvolvimento. Mais de 90% do conteúdo total de gangliósidos do cérebro adulto é composto por estas quatro espécies de gangliósidos [117]. O GM3 e GD3 são precursores, por via enzimática, desses gangliósidos mais complexos, como revisto em [118,119].

Em determinadas doenças neurodegenerativas foram observadas variações na concentração de gangliósidos. Por exemplo, em algumas regiões do SNC de doentes de Alzheimer foi observado uma diminuição na concentração de gangliósidos complexos da série gânglio GT1b, GD1b, GD1a, GM1, e um aumento na concentração de gangliósidos “simples”, tais como GM2, GM3, GM4 [120]. Em pacientes com esclerose lateral amiotrófica, uma outra doença neurodegenerativa, também observaram um aumento nas concentrações de GM2 e GD3 (gangliósidos simples) [121]. Estudos recentes sugeriram que a acumulação de gangliósidos simples nos AD surge como um resultado da quebra dos gangliósidos mais complexos da serie A por vias de degradação enzimática. No entanto os padrões de expressão observados para o GM1 e GD1a sugeriram que as vias de degradação podem ser mais complexas [122]. Neste contexto, os nossos resultados permitem-nos sugerir que, *in vivo* sob condições de *stress* oxidativo, gangliósidos mais complexos, os essenciais para uma boa performance do cérebro, podem em certas condições patológicas associadas ao aumento de *stress* oxidativo e ao aumento de ROS, sofrer degradação também por vias oxidativas não controladas enzimaticamente. Assim, ambas as vias (degradação enzimática e quebras oxidativas) podem contribuir para a acumulação de gangliósidos simples através da degradação dos mais complexos.

A redução de gangliósidos complexos combinada com a acumulação de gangliósidos simples conduzirá a várias implicações fisiológicas, uma vez que modifica a concentração ótima dos gangliósidos específicos requeridos para uma boa performance do cérebro como anteriormente descrito: conteúdo total de gangliósidos do cérebro adulto é praticamente (> 90%) composto por gangliósidos complexos [117]. Além disso, sabe-se

que os gangliósidos desempenham várias funções importantes na manutenção da integridade e funcionalidade das membranas, na regulação do desenvolvimento do cérebro, tem atividade imunoregulatória, entre outras [20,123–125]. Deste modo estas funções podem estar comprometidas levando a distúrbios nas propriedades estruturais das membranas, implicações no desenvolvimento cerebral assim como inibir ou exacerbar a inflamação nos tecidos do SNC (onde se encontram preferencialmente localizados). Estudos prévios verificaram que uma acumulação de GM3 no tecido nervoso possui efeitos tóxicos e promove a morte dos neurónios no sistema nervoso [108,126–128].

No nosso estudo, devido à degradação oxidativa do GM1, como acima mencionado também foi possível observar a libertação de ceramidas. Está descrito na literatura um aumento de ceramidas em cérebros de doentes de Alzheimer e de outras doenças neurodegenerativas [129]. Todavia nestes estudos têm associado o aumento de ceramidas nos AD a alterações oxidativas nas vias enzimáticas [130]. As ceramidas são agentes pro-apoptóticos que promovem a morte das células nervosas que levam à doença de Alzheimer (AD) [128]. Em estudos recentes observaram ainda que os glicosfingolípídeos sob oxidações distintas sofrem degradação oxidativa levando também à formação de ceramidas [10,12,112]. Assim e de acordo com estudos prévios as presentes constatações do nosso trabalho sugerem que o *stress* oxidativo deve ter um papel importante na produção e acumulação descontrolada de ceramidas por degradação oxidativa de gangliósidos.



**Esquema 4-2: A formação de novos gangliósidos, glicosfingolípídeos e ceramidas através de uma degradação não enzimática do GM1.** Nossa proposta para a formação dos produtos formados devido à quebra oxidativa das ligações glicosídicas da cadeia de hidratos de carbono do GM1 pelo radical hidroxila, formado por reação de Fenton. a) -NeuAc<sub>res</sub>, b) -Gal<sub>res</sub> (IV), c) -GalNAc<sub>res</sub> (III), d) -Gal<sub>res</sub> (II), e) -Glc<sub>res</sub> (I).



Este estudo dá uma nova perspetiva relativamente à possível contribuição da oxidação radicalar em células sob *stress* oxidativo e da sua contribuição para a despolimerização de gangliósidos, com formação de outros gangliósidos (essencialmente GM2 e GM3) e ceramidas, que pode estar a contribuir para a neurodegeneração e exacerbação da inflamação observadas nas doenças neurodegenerativas. É de realçar, que estudos prévios já têm sugerido a administração exógena de gangliósidos complexos GM1 e GD1, *in vitro*, como sendo benéfica na recuperação de algumas doenças neurodegenerativas [131,132]. Outra das hipóteses que tem sido considerada para o tratamento destas doenças é a utilização de enzimas da biossíntese dos glicosfingolípidos como alvos terapêuticos na atenuação de alguns sintomas em AD [119].

Assim será importante em estudos futuros clarificar qual o papel do *stress* oxidativo, *in vivo*, na variação da composição dos gangliósidos nas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. A investigação nesta área particular pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos, ou pelo menos, levar ao desenvolvimento de procedimentos adicionais a fim de maximizar a qualidade de vida dos pacientes.

### 4.3. Conclusões

Os resultados obtidos sugerem que o GM1 e, por conseguinte, os gangliósidos podem ser oxidados por radicais hidroxilo em ambientes aquosos e depois da preparação prévia dos lipossomas. Durante a reação *in vitro* do radical hidroxilo com o GM1, formaram-se outros gangliósidos e glicolípidos, nomeadamente o GM2, GM3, asialoGM1, asialoGM2, LacCer, GlcCer e à Cer. A formação destes gangliósidos e o aumento de ceramidas pode causar um desequilíbrio no esfingolipidoma celular e consequentemente alterações na sinalização celular.

Será interessante no futuro avaliar a associação da oxidação radicalar do GM1 na contribuição para a neurodegeneração e inflamação observada nos pacientes com doenças neurodegenerativas.



---

## Capítulo 5.

---

Conclusões e perspectivas futuras



## 5. Conclusões e perspectivas futuras

De acordo com os objetivos propostos, neste trabalho, foram identificados e caracterizados estruturalmente por espectrometria de massa, espectrometria de massa tandem e espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida, os produtos de oxidação de dois GSLs simples (GalCer e LacCer) e de um gangliósido o GM1 (um glicosfingolípido ácido), obtidos sob condições de Fenton.

A oxidação destes glicosfingolípidos levou à formação de alguns produtos de oxidação comuns. Entre estes destacamos a formação de ceramidas durante a oxidação radicalar dos GSLs estudados, bem como algumas espécies de ceramidas oxidadas. No caso da C16:0GalCer não foram observadas estas espécies. Foi ainda possível detetar GSLs oxigenados, nomeadamente derivados ceto e hidroxilados para todos os GSLs, com exceção da C16:0GalCer saturada, e hidroperóxidos lipídicos, apenas no caso dos GSLs simples constituídos por ácidos gordos insaturados. Os derivados oxigenados dos GSLs insaturados (C24:1GalCer e C24:1LacCer) indicaram que a oxidação ocorreu na cadeia de ácido gordo monoinsaturada junto à dupla ligação. Não foram observados iões que nos sugerissem a oxidação na cadeia de esfingosina (d18:1). Em contrapartida, os derivados oxigenados hidroxi do GM1(d18:1/C18:0) indicaram oxidação na cadeia de esfingosina (d18:1) e não na sua cadeia de ácido gordo saturada (C18:0). Estes dados estão de acordo com facto de que os ácidos gordos saturados não são suscetíveis à oxidação por radicais hidroxilo. Por outro lado, os derivados oxigenados ceto do GM1 indicaram a ocorrência de oxidação na cadeia de hidratos de carbono com formação de um ácido urónico em C6, com a existência de isómeros posicionais, à semelhança do que foi observado para pequenos oligossacarídeos [13]. Ainda, no MS do GM1 exposto à oxidação por radicais hidroxilo, observámos produtos de oxidação com perda de parte da cadeia carbonada da esfingosina, devido à quebra da respetiva cadeia entre as ligações C3-C4 (com um grupo ácido carboxílico terminal em C3) e C2-C3 (com um grupo hidroxilo terminal em C2).

Curiosamente, a oxidação radicalar promoveu a despolimerização de todos os GSLs, originando outros GSLs mais simples. No caso da oxidação de GM1, a quebra de ligações glicosídicas levou à formação de novos gangliósidos: GM2, GM3, asialoGM1, asialoGM2, ao globósido: LacCer e ao cerebrósido: GlcCer. Em alguns destes produtos de oxidação observaram-se os correspondentes derivados oxigenados. No caso das ceramidas,

da GalCer, LacCer e GM1, também se observaram os correspondentes derivados oxigenados. Todos estes produtos podem ter implicações fisiológicas *in vivo* e portanto futuramente é importante verificar se a oxidação destes glicosfingolípidos neutros e acídicos ocorre de forma semelhante, com a formação destes produtos de oxidação.

O *stress* oxidativo tem sido associado a inúmeras doenças, tais como as doenças neurodegenerativas, cardiológicas e muitas doenças associadas a idade. Em algumas destas doenças, particularmente as doenças neurodegenerativas, foram observadas variações no perfil normal dos gangliósidos e de ceramidas [120,121,129]. Esta variação já foi atribuída ao *stress* oxidativo, por alteração oxidativa nas enzimas da biossíntese dos GSLs. No entanto, ainda não foi confirmada a possível influência do *stress* oxidativo na modificação estrutural dos GSLs com a variação do conteúdo normal destes (previamente observada nestes doentes). Com este estudo é possível propor como hipótese que, em organismos vivos, sob *stress* oxidativo, os gangliósidos mais complexos podem sofrer degradação em gangliósidos mais simples por quebra das suas ligações glicosídicas, por uma via oxidativa radicalar não controlada enzimaticamente. Sabe-se que cada GSL exerce funções específicas no organismo, essencialmente no SNC onde estão localizados em maiores concentrações. Adicionalmente, sabe-se que o conteúdo de gangliósidos normal no cérebro adulto é maioritariamente (> 90%) constituído por 4 gangliósidos complexos (GM1a, GD1a, GD1b e GT1b) [117]. Assim, a diminuição de gangliósidos complexos e o consequente aumento de gangliósidos simples nos sistemas vivos poderá ter importantes efeitos fisiológicos.

A acumulação *in vitro* de ceramidas (devido à oxidação dos GSLs e do GM1) e acumulação de GM3 (devido à oxidação do GM1), como agentes pro-apoptóticos [127,128], pode *in vivo* contribuir para a morte progressiva das células nervosas do tecido cerebral nos doentes sob *stress* oxidativo. Ainda, a fragmentação da GalCer, um importante GSL que corresponde a 20 % do conteúdo lipídico das membranas de mielina, em Cer nas células do SNC e SNP conduzirá a perda das suas funções [110] Esta perda funcional poderá causar distúrbios nas propriedades estruturais da membrana da mielina, uma vez que défice deste GSL na mielina não é contrabalançado por outro lípido [10].

Embora se comecem a dar os primeiros passos na identificação das modificações oxidativas de glicosfingolípidos e gangliósidos, em especial pela utilização de abordagens

analíticas avançadas usando espectrometria de massa e espectrometria de massa tandem, um vasto trabalho permanece por realizar. De facto, os GSL como moléculas sinalizadoras essenciais para uma homeostase regulada das células tornam o conhecimento estrutural das modificações oxidativas, que podem ocorrer nestes lípidos, essencial para um entendimento dos próprios mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de diversas doenças, em particular de doenças neurodegenerativas. O conhecimento nesta área pode levar assim à descoberta de novos alvos terapêuticos ou medidas de prevenção destas patologias para maximizar a qualidade de vida dos pacientes.

Idealmente seria interessante completar as bases de dados lipídicas de fácil acesso já existentes, com os valores de  $m/z$  correspondentes aos iões moleculares dos GSLs, com os produtos de oxidação de cada espécie lipídica, para diferentes métodos de oxidação (com ROS, foto oxidação, entre outras). Finalmente, comparar o perfil lipídico de doentes sob *stress* oxidativo com controlos e verificar a possibilidade de alguns destes produtos de oxidação identificados aqui poderem ser utilizados como biomarcadores de doenças. Similarmente ao 4-HNE, um produto de peroxidação lipídica, utilizado como biomarcador nos doentes de Alzheimer, uma vez que está marcadamente elevado nestes doentes em comparação com os indivíduos saudáveis [4]. É ainda necessário estabelecer uma correlação entre os possíveis efeitos do *stress* oxidativo nas modificações estruturais dos gangliósidos, e na concentração dos produtos de oxidação. Desta forma poder-se-ia estudar a relação da variação do glicosfingolipidoma em determinadas condições patológicas associadas ao *stress* oxidativo, como nas doenças neurodegenerativas, entre outras.



---

## Capítulo 6.

---

Referências





## 6. Referências

- [1] P. Møller, H. Wallin, L.E. Knudsen, Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors, *Chem. Biol. Interact.* 102 (1996) 17–36.
- [2] E.J. Dufourc, A. Catalá, Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model,” *Biochimie.* 94 (2012) 101–109.
- [3] M. Gubandru, D. Margina, C. Tsitsimpikou, N. Goutzourelas, K. Tsarouhas, M. Ilie, A.M. Tsatsakis, D. Kouretas, Alzheimer’s disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers, *Food Chem. Toxicol.* 61 (2013) 209–14.
- [4] M. Schrag, C. Mueller, M. Zabel, A. Crofton, W.M. Kirsch, O. Ghribi, R. Squitti, G. Perry, Oxidative stress in blood in Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis, *Neurobiol. Dis.* 59 (2013) 100–110.
- [5] R.A. Floyd, Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222 (1999) 236–45.
- [6] S. Varadarajan, S. Yatin, M. Aksenova, D.A. Butterfield, Review: Alzheimer’s Amyloid  $\beta$ -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity, *J. Struct. Biol.* 130 (2000) 184–208.
- [7] J. Barr, C.S. Sharma, S. Sarkar, K. Wise, L. Dong, A. Periyakaruppan, G.T. Ramesh, Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells., *Mol. Cell. Biochem.* 297 (2007) 93–9.
- [8] A. Catalá, Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions, *Chem. Phys. Lipids.* 157 (2009) 1–11.
- [9] T. Melo, E. Maciel, M.M. Oliveira, P. Domingues, M.R.M. Domingues, Study of sphingolipids oxidation by ESI tandem MS, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114 (2012) 726–732.
- [10] I. Yurkova, M. Kisel, J. Arnhold, O. Shadyro, Free-radical fragmentation of galactocerebrosides: a MALDI-TOF mass spectrometry study, *Chem. Phys. Lipids.* 134 (2005) 41–49.
- [11] I. Meisen, M. Mormann, J. Müthing, Thin-layer chromatography, overlay technique and mass spectrometry: A versatile triad advancing glycosphingolipidomics, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1811 (2011) 875–896.
- [12] O. Shadyro, I. Yurkova, M. Kisel, O. Brede, J. Arnhold, Formation of phosphatidic acid, ceramide, and diglyceride on radiolysis of lipids: identification by MALDI-TOF mass spectrometry, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 1612–1624.
- [13] J. Tudella, F.M. Nunes, R. Paradela, D. V. Evtuguin, P. Domingues, F. Amado, M.A. Coimbra, A.I.R.N.A. Barros, M.R.M. Domingues, Oxidation of mannosyl oligosaccharides by hydroxyl radicals as assessed by electrospray mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 2603–2611.
- [14] C. Simões, V. Simões, A. Reis, P. Domingues, M.R.M. Domingues, Oxidation of glycated phosphatidylethanolamines: evidence of oxidation in glycated polar head identified by LC-MS/MS., *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2417–27.
- [15] D.J. Sillence, R.J. Raggars, D.C. Neville, D.J. Harvey, G. van Meer, Assay for the transbilayer distribution of glycolipids. Selective oxidation of glucosylceramide to glucuronylceramide by TEMPO nitroxyl radicals., *J. Lipid Res.* 41 (2000) 1252–60.
- [16] F.-F. Hsu, J. Turk, Structural determination of glycosphingolipids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisional-activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 61–79.
- [17] V. Hunnam, D.J. Harvey, D.A. Priestman, R.H. Bateman, R.S. Bordoli, R. Tyldesley, Ionization and fragmentation of neutral and acidic glycosphingolipids with a Q-TOF mass spectrometer fitted with a MALDI ion source, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 1220–1225.
- [18] E. Ito, H. Waki, K. Miseki, T. Shimada, T.-A. Sato, K. Kakehi, M. Suzuki, A. Suzuki, Structural characterization of neutral glycosphingolipids using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry with a repeated high-speed polarity and MSn switching system, *Glycoconj. J.* 30 (2013) 881–8.

- [19] A. Shamshiev, A. Donda, T.I. Prigozy, L. Mori, V. Chigorno, C.A. Benedict, L. Kappos, S. Sonnino, M. Kronenberg, G. De Libero, The  $\alpha\beta$  T Cell Response to Self-Glycolipids Shows a Novel Mechanism of CD1b Loading and a Requirement for Complex Oligosaccharides, *Immunity*. 13 (2000) 255–264.
- [20] S. Ladisch, H. Becker, L. Ulsh, Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses, *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1125 (1992) 180–188.
- [21] D.B. Moody, G.S. Besra, Glycolipid targets of CD1-mediated T-cell responses, *Immunology*. 104 (2001) 243–251.
- [22] N.R. Cohen, S. Garg, M.B. Brenner, Chapter 1 Antigen Presentation by CD1, *Adv. Immunol.* 102 (2009) 1–94.
- [23] Y. Li, P. Thapa, D. Hawke, Y. Kondo, K. Furukawa, K. Furukawa, F.-F. Hsu, D. Adlercreutz, J. Weadge, M.M. Palcic, P.G. Wang, S.B. Lavery, D. Zhou, Immunologic glycosphingolipidomics and NKT cell development in mouse thymus., *J. Proteome Res.* 8 (2009) 2740–51.
- [24] D. Zhou, J. Mattner, C. Cantu, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y.-P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. Wang, R.L. Proia, S.B. Lavery, P.B. Savage, L. Teyton, A. Bendelac, Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells., *Science*. 306 (2004) 1786–9.
- [25] A. Shamshiev, A. Donda, I. Carena, L. Mori, L. Kappos, G. De Libero, Self glycolipids as T-cell autoantigens., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 1667–75.
- [26] E. Nekrasov, U. Hubl, Gangliosides, in: *Sialobiology Struct. Biosynth. Funct. Sialic Acid Glycoconjugates Heal. Dis.*, 2013: pp. 313–380.
- [27] K. Sandhoff, T. Kolter, Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358 (2003) 847–61.
- [28] D. Santinha, E. Ferreira-Fernandes, T. Melo, E.M.P. Silva, E. Maciel, M. Fardilha, P. Domingues, M.R.M. Domingues, Evaluation of the photooxidation of galactosyl- and lactosylceramide by electrospray ionization mass spectrometry., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 2275–84.
- [29] L.D. Youngman, J.Y. Park, B.N. Ames, Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1992) 9112–9116.
- [30] V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, R. Mitchell, Robbins Basic Pathology, Elsevier Health Sciences, 2007.
- [31] J.C. Fernández-Checa, Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003) 471–479.
- [32] P.A. Figueiredo, M.P. Mota, H.J. Appell, J.A. Duarte, The role of mitochondria in aging of skeletal muscle., *Biogerontology*. 9 (2008) 67–84.
- [33] G. Paradies, G. Petrosillo, V. Paradies, F.M. Ruggiero, Mitochondrial dysfunction in brain aging: Role of oxidative stress and cardiolipin, *Neurochem. Int.* 58 (2011) 447–457.
- [34] M. M, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J.* 417 (2009) 1–13.
- [35] Q. Chen, E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnefsky, Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 36027–31.
- [36] M.J. Jackson, S. Papa, J. Bolaños, R. Bruckdorfer, H. Carlsen, R.M. Elliott, J. Flier, H.R. Griffiths, S. Heales, B. Holst, M. Lorusso, E. Lund, J. Øivind Moskaug, U. Moser, M. Di Paola, M. Cristina Polidori, A. Signorile, W. Stahl, J. Viña-Ribes, S.B. Astley, Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function, *Mol. Aspects Med.* 23 (2002) 209–285.
- [37] I.G. Kirkinezos, C.T. Moraes, Reactive oxygen species and mitochondrial diseases, *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 449–457.
- [38] F. Gozzo, Radical and non-radical chemistry of the Fenton-like systems in the presence of organic substrates, *J. Mol. Catal. A Chem.* 171 (2001) 1–22.
- [39] R. V. Lloyd, P.M. Hanna, R.P. Mason, The Origin of the Hydroxyl Radical Oxygen in the Fenton Reaction, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 885–888.
- [40] X. Xue, K. Hanna, N. Deng, Fenton-like oxidation of Rhodamine B in the presence of two types of iron (II, III) oxide, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 407–414.

- [41] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update, *FEBS Lett.* 307 (1992) 108–112.
- [42] S. Krifka, G. Spagnuolo, G. Schmalz, H. Schweikl, A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers, *Biomaterials.* 34 (2013) 4555–4563.
- [43] R. Piga, Y. Saito, Y. Yoshida, E. Niki, Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: Involvement of oxidative stress and effect of antioxidants, *Neurotoxicology.* 28 (2007) 67–75.
- [44] G.O. Fruhwirth, A. Loidl, A. Hermetter, Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1772 (2007) 718–736.
- [45] G.S. Ribas, R. Pires, J.C. Coelho, D. Rodrigues, C.P. Mescka, C.S. Vanzin, G.B. Biancini, G. Negretto, C.A.Y. Wayhs, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxynojirimycin therapy., *Int. J. Dev. Neurosci.* 30 (2012) 439–44.
- [46] F. Shahidi, Y. Zhong, Lipid oxidation and improving the oxidative stability., *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4067–79.
- [47] M.A. Flerov, T.I. Tolstukhina, I.A. Gerasimova, Free radical lipid oxidation in brain cortex neurons and neuroglia during convulsions., *Bull. Exp. Biol. Med.* 138 (2004) 341–2.
- [48] V.E. Kagan, H.A. Bayır, N.A. Belikova, O. Kapralov, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, J. Jiang, D.A. Stoyanovsky, P. Wipf, P.M. Kochanek, J.S. Greenberger, B. Pitt, A.A. Shvedova, G. Borisenko, Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 1439–1453.
- [49] R. Sultana, P. Mecocci, F. Mangialasche, R. Cecchetti, M. Baglioni, D.A. Butterfield, Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this, *J. Alzheimers. Dis.* 24 (2011) 77–84.
- [50] D. Praticò, P. Reiss, L.X. Tang, S. Sung, J. Rokach, T.K. McIntosh, Local and systemic increase in lipid peroxidation after moderate experimental traumatic brain injury., *J. Neurochem.* 80 (2002) 894–8.
- [51] V.N. Bochkov, O. V. Oskolkova, K.G. Birukov, A.-L. Levonen, C.J. Binder, J. Stöckl, Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids., *Antioxid Redox Signal.* 12 (2010) 1009–59.
- [52] I. P. EDIMECHEVA, M. A. KISEL, O. I. S, The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone, *Int. J. Radiat. Biol.* 71 (1997) 555–560.
- [53] G. Spiteller, Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 362–387.
- [54] P. Kinnunen, A. Hermetter, C.M. Spickett, A. Reis, C.M. Spickett, Chemistry of phospholipid oxidation, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818 (2012) 2374–2387.
- [55] M.R.M. Domingues, A. Reis, P. Domingues, Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids., *Chem. Phys. Lipids.* 156 (2008) 1–12.
- [56] D.L. Nelson, A.L. Lehninger, M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman, 2008.
- [57] A.H. Merrill, R.C. Murphy, E. Fahy, D. Cotter, M. Sud, S. Subramaniam, Lipid classification, structures and tools, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1811 (2011) 637–647.
- [58] V.A. Bankaitis, J. Bielawski, Z.M. Szulc, Y.A. Hannun, A. Bielawska, Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Methods.* 39 (2006) 82–91.
- [59] A.H. Merrill, M.D. Wang, M. Park, M.C. Sullards, (Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 457–468.
- [60] Y. Chen, Y. Liu, M.C. Sullards, A.H. Merrill, An introduction to sphingolipid metabolism and analysis by new technologies., *Neuromolecular Med.* 12 (2010) 306–19.
- [61] S.T. Pruett, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C.A. Haynes, M.C. Sullards, D.C. Liotta, A.H. Merrill, Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols., *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1621–39.

- [62] M.A. Chester, Nomenclature of Glycolipids (IUPAC Recommendations 1997), *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 2475–2488.
- [63] Klenk E., Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiol. Chemie.* 273 (1942) 76–86.
- [64] H. Zigdon, A. Kogot-Levin, J.-W. Park, R. Goldschmidt, S. Kelly, A.H. Merrill, A. Scherz, Y. Pewzner-Jung, A. Saada, A.H. Futerman, Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain., *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 4947–56.
- [65] T. Hornemann, S. Richard, M.F. Rütli, Y. Wei, A. von Eckardstein, Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase., *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 37275–81.
- [66] N.C. Zitomer, T. Mitchell, K.A. Voss, G.S. Bondy, S.T. Pruett, E.C. Garnier-Amblard, L.S. Liebeskind, H. Park, E. Wang, M.C. Sullards, A.H. Merrill, R.T. Riley, Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine: a novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4786–95.
- [67] Y.A. Hannun, C. Luberto, Ceramide in the eukaryotic stress response, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 73–80.
- [68] N. Baumann, D. Pham-Dinh, Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System, *Physiol Rev.* 81 (2001) 871–927.
- [69] Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, N.F. Avrova, V.E. Kagan, Ganglioside-dependent factor inhibiting lipid peroxidation in synaptosomal membranes, *Bull. Exp. Biol. Med.* 109 (1990) 734–737.
- [70] A. Schwarz, A.H. Futerman, The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of anti-ganglioside antibodies, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1286 (1996) 247–267.
- [71] T. V. Sokolova, V. V. Furaev, I. V. Victorov, N.A. Andreeva, N.F. Avrova, Stimulation by Gangliosides of Viability of Rat Brain Neurons and of Neuronal PC12 Cell Line under Conditions of Oxidative Stress, *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41 (2005) 415–423.
- [72] L. Svennerholm, Gangliosides and Synaptic Transmission, *Adv Exp Med Biol.* 125 (1980) 533–544.
- [73] M.T. Vanier, M. Holm, R. Öhman, L. Svennerholm, Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain, *J. Neurochem.* 18 (1971) 581–592.
- [74] P.D. Thomas, G.J. Brewer, Gangliosides and synaptic transmission, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1031 (1990) 277–289.
- [75] J. Moss, P.H. Fishman, V.C. Manganiello, M. Vaughan, R.O. Brady, Functional incorporation of ganglioside into intact cells: induction of cholera toxin responsiveness., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 (1976) 1034–1037.
- [76] J.S. SCHNEIDER, GM1 Ganglioside in the Treatment of Parkinson's Disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845 (1998) 363–373.
- [77] J.M. Wells, R.F. Ventura, P.B. Eisenhauer, D.C. McKenna, R.E. Fines, M.D. Ullman, Transport of GM1 and GM1 inner ester across an in vitro model of the blood-brain barrier, *Neurosci. Lett.* 217 (1996) 121–124.
- [78] N.F. Avrova, I. V Victorov, V.A. Tyurin, I.O. Zakharova, T. V Sokolova, N.A. Andreeva, E. V Stelmaschuk, Y.Y. Tyurina, V.S. Gonchar, Inhibition of glutamate-induced intensification of free radical reactions by gangliosides: possible role in their protective effect in rat cerebellar granule cells and brain synaptosomes., *Neurochem. Res.* 23 (1998) 945–52.
- [79] D. Shao, A.W. Segal, L. V. Dekker, Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils, *FEBS Lett.* 550 (2003) 101–106.
- [80] F. Barabé, G. Paré, M.J.G. Fernandes, S.G. Bourgoin, P.H. Naccache, Cholesterol-modulating agents selectively inhibit calcium influx induced by chemoattractants in human neutrophils., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 13473–8.
- [81] A.K. Stanic, A.D. De Silva, J.-J. Park, V. Sriram, S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, K. Hayakawa, L. Van Kaer, R.R. Brutkiewicz, S. Joyce, Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Val14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 1849–54.

- [82] L.J. Sparvero, A.A. Amoscato, P.M. Kochanek, B.R. Pitt, V.E. Kagan, H. Bayir, Mass-spectrometry based oxidative lipidomics and lipid imaging: applications in traumatic brain injury., *J. Neurochem.* 115 (2010) 1322–36.
- [83] C. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley, 2007.
- [84] E. Maciel, P. Domingues, M.R.M. Domingues, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of long-chain oxidation products of cardiolipin induced by the hydroxyl radical., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 316–26.
- [85] H. Yin, B.E. Cox, W. Liu, N.A. Porter, J.D. Morrow, G.L. Milne, Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry., *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 672–80.
- [86] E. Maciel, R.N. da Silva, C. Simões, P. Domingues, M.R.M. Domingues, Structural characterization of oxidized glycerophosphatidylserine: evidence of polar head oxidation., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1804–14.
- [87] A.S.P. Moreira, E. V da Costa, D. V Evtuguin, M.A. Coimbra, F.M. Nunes, M.R.M. Domingues, Neutral and acidic products derived from hydroxyl radical-induced oxidation of arabinotriose assessed by electrospray ionisation mass spectrometry., *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 280–90.
- [88] T. Ii, Y. Ohashi, Y. Nagai, Structural elucidation of underivatized gangliosides by electrospray-ionization tandem mass spectrometry (ESIMS/MS)., *Carbohydr. Res.* 273 (1995) 27–40.
- [89] A.D. Watson, Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 2101–2111.
- [90] M.C. Sullards, Y. Liu, Y. Chen, A.H. Merrill, Analysis of mammalian sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and tissue imaging mass spectrometry (TIMS)., *Biochim. Biophys. Acta.* 1811 (2011) 838–53.
- [91] K.K. Baskin, H. Taegtmeier, AMP-activated protein kinase regulates E3 ligases in rodent heart, *Circ. Res.* 109 (2011) 1153–1161.
- [92] X. Han, R.W. Gross, Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics., *J. Lipid Res.* 44 (2003) 1071–9.
- [93] R.B. Cole, Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry., *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 763–72.
- [94] R. Taguchi, T. Houjou, H. Nakanishi, T. Yamazaki, M. Ishida, M. Imagawa, T. Shimizu, Focused lipidomics by tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 823 (2005) 26–36.
- [95] M. Gu, J.L. Kerwin, J.D. Watts, R. Aebersold, Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry., *Anal. Biochem.* 244 (1997) 347–56.
- [96] F.-F. Hsu, J. Turk, Studies on sulfatides by quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization: structural characterization and the fragmentation processes that include an unusual internal galactose residue loss and the classical charge-remote fragmentation., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 536–46.
- [97] A.H. Merrill, M.C. Sullards, J.C. Allegood, S. Kelly, E. Wang, Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry., *Methods.* 36 (2005) 207–24.
- [98] C.A. Haynes, J.C. Allegood, H. Park, M.C. Sullards, Sphingolipidomics: methods for the comprehensive analysis of sphingolipids., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2696–708.
- [99] A.H. Merrill, T.H. Stokes, A. Momin, H. Park, B.J. Portz, S. Kelly, E. Wang, M.C. Sullards, M.D. Wang, Sphingolipidomics: a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease., *J. Lipid Res.* 50 Suppl (2009) S97–102.
- [100] H. Farwanah, T. Kolter, K. Sandhoff, Mass spectrometric analysis of neutral sphingolipids: Methods, applications, and limitations, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1811 (2011) 854–860.
- [101] P. Domingues, M.R. Domingues, F.M. Amado, A.J. Ferrer-Correia, Characterization of sodiated glycerol phosphatidylcholine phospholipids by mass spectrometry., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 799–804.



- [102] A. Reis, P. Domingues, A.J. V Ferrer-Correia, M.R.M. Domingues, Tandem mass spectrometry of intact oxidation products of diacylphosphatidylcholines: evidence for the occurrence of the oxidation of the phosphocholine head and differentiation of isomers., *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1513–22.
- [103] A. Reis, M.R.M. Domingues, F.M.L. Amado, A.J. V Ferrer-Correia, P. Domingues, Separation of peroxidation products of diacyl-phosphatidylcholines by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry., *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 129–37.
- [104] J.J. Villaverde, V. van der Vlist, S. a. O.O. Santos, T. Haarmann, K. Langfelder, M. Pirttimaa, A. Nyssölä, S. Jylhä, T. Tamminen, K. Kruus, L. de Graaff, C.P. Neto, M.M.Q.Q. Simões, M.R.M.R.M. Domingues, A.J.D.D. Silvestre, J. Eidner, J. Buchert, Hydroperoxide production from linoleic acid by heterologous *Gaeumannomyces graminis tritici* lipoxygenase: Optimization and scale-up, *Chem. Eng. J.* 217 (2013) 82–90.
- [105] T. Melo, R.A. Videira, S. André, E. Maciel, C.S. Francisco, A.M. Oliveira-Campos, L.M. Rodrigues, M.R.M. Domingues, F. Peixoto, M.M. Oliveira, Tacrine and its analogues impair mitochondrial function and bioenergetics: A lipidomic analysis in rat brain, *J. Neurochem.* 120 (2012) 998–1013.
- [106] Y. Zhou, H. Park, P. Kim, Y. Jiang, C.E. Costello, Surface oxidation under ambient air—not only a fast and economical method to identify double bond positions in unsaturated lipids but also a reminder of proper lipid processing., *Anal. Chem.* 86 (2014) 5697–705.
- [107] B.M. Castro, M. Prieto, L.C. Silva, Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties., *Prog. Lipid Res.* 54 (2014) 53–67.
- [108] W.-C. Huang, C.-L. Chen, Y.-S. Lin, C.-F. Lin, Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy., *J. Lipids.* 2011 (2011) 565316.
- [109] S. Schmitt, L. Cantuti Castelvetti, M. Simons, Metabolism and functions of lipids in myelin., *Biochim. Biophys. Acta.* 1851 (2015) 999–1005.
- [110] A. Bosio, E. Binczek, W. Stoffel, Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 13280–5.
- [111] E. Ito, A. Tominaga, H. Waki, K. Miseki, A. Tomioka, K. Nakajima, K. Kakehi, M. Suzuki, N. Taniguchi, A. Suzuki, Structural characterization of monosialo-, disialo- and trisialo-gangliosides by negative ion AP-MALDI-QIT-TOF mass spectrometry with MS(n) switching., *Neurochem. Res.* 37 (2012) 1315–24.
- [112] D. Couto, D. Santinha, T. Melo, E. Ferreira-Fernandes, R.A. Videira, A. Campos, M. Fardilha, P. Domingues, M.R.M. Domingues, Glycosphingolipids and oxidative stress: Evaluation of hydroxyl radical oxidation of galactosyl and lactosylceramides using mass spectrometry., *Chem. Phys. Lipids.* 191 (2015) 106–114.
- [113] Q. Ann, J. Adams, Structure-specific collision-induced fragmentations of ceramides cationized with alkali-metal ions, *Anal. Chem.* 65 (1993) 7–13.
- [114] B. Domon, C.E. Costello, Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry, *Biochemistry.* 27 (1988) 1534–1543.
- [115] Q. Ann, J. Adams, Structure determination of ceramides and neutral glycosphingolipids by collisional activation of [M + Li](+) ions., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3 (1992) 260–3.
- [116] I.L. Yurkova, Free-radical reactions of glycerolipids and sphingolipids, *Russ. Chem. Rev.* 81 (2012) 175–190.
- [117] S. Ando, N.-C. Chang, R.K. Yu, High-performance thin-layer chromatography and densitometric determination of brain ganglioside compositions of several species, *Anal. Biochem.* 89 (1978) 437–450.
- [118] K. Palmano, A. Rowan, R. Guillermo, J. Guan, P. McJarrow, The role of gangliosides in neurodevelopment., *Nutrients.* 7 (2015) 3891–913.
- [119] R.K. Yu, Y.-T. Tsai, T. Ariga, Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances., *Neurochem. Res.* 37 (2012) 1230–44.
- [120] I. Kracun, S. Kalanj, J. Talan-Hranilovic, C. Cosovic, Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* 20 (1992) 433–438.
- [121] M.M. Rapport, H. Donnenfeld, W. Brunner, B. Hungund, H. Bartfeld, Ganglioside patterns in amyotrophic lateral sclerosis brain regions., *Ann. Neurol.* 18 (1985) 60–7.

- [122] S. Caughlin, J.D. Hepburn, D.H. Park, K. Jurcic, K.K.-C. Yeung, D.F. Cechetto, S.N. Whitehead, Increased Expression of Simple Ganglioside Species GM2 and GM3 Detected by MALDI Imaging Mass Spectrometry in a Combined Rat Model of A $\beta$  Toxicity and Stroke., *PLoS One*. 10 (2015) e0130364.
- [123] C. a. Lingwood, Glycosphingolipid functions, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) 1–26.
- [124] E. Posse de Chaves, S. Sipione, Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction, *FEBS Lett.* 584 (2010) 1748–1759.
- [125] S. Sonnino, V. Chigorno, Ganglioside molecular species containing C18- and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures., *Biochim. Biophys. Acta.* 1469 (2000) 63–77.
- [126] H. Sohn, Y.-S. Kim, H.-T. Kim, C.-H. Kim, E.-W. Cho, H.-Y. Kang, N.-S. Kim, C.-H. Kim, S.E. Ryu, J.-H. Lee, J.H. Ko, Ganglioside GM3 is involved in neuronal cell death., *FASEB J.* 20 (2006) 1248–50.
- [127] N. V. Prokazova, N.N. Samovilova, E. V. Gracheva, N.K. Golovanova, Ganglioside GM3 and its biological functions, *Biochem.* 74 (2009) 235–249.
- [128] K. Czubowicz, R. Strosznajder, Ceramide in the molecular mechanisms of neuronal cell death. The role of sphingosine-1-phosphate., *Mol. Neurobiol.* 50 (2014) 26–37.
- [129] V. Filippov, M.A. Song, K. Zhang, H. V Vinters, S. Tung, W.M. Kirsch, J. Yang, P.J. Duerksen-Hughes, Increased ceramide in brains with Alzheimer’s and other neurodegenerative diseases., *J. Alzheimers. Dis.* 29 (2012) 537–47.
- [130] R.G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, W.A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J.C. Troncoso, M.P. Mattson, Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer’s disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 2070–5.
- [131] F. Kreutz, R.L. Frozza, A.C. Breier, V.A. de Oliveira, A.P. Horn, L.F. Pettenuzzo, C.A. Netto, C.G. Salbego, V.M.T. Trindade, Amyloid- $\beta$  induced toxicity involves ganglioside expression and is sensitive to GM1 neuroprotective action., *Neurochem. Int.* 59 (2011) 648–55.
- [132] J.S. Schneider, S.M. Gollomp, S. Sendek, A. Colcher, F. Cambi, W. Du, A randomized, controlled, delayed start trial of GM1 ganglioside in treated Parkinson’s disease patients., *J. Neurol. Sci.* 324 (2013) 140–8.